

**DARSTELLUNG UND KOMPLEXVERHALTEN
VON NEUEN ACRYLSÄURECOPOLYMEREN
SOWIE DEREN KOPPLUNG MIT INSULIN**

Hans-Gernot Biedermann

1978



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus der Forschergruppe Diabetes und der III. Medizinischen
Abteilung des Krankenhauses München-Schwabing
Chefarzt: Professor Dr. H. Mehnert

DARSTELLUNG UND KOMPLEXVERHALTEN VON NEUEN ACRYLSÄURE-
COPOLYMEREN SOWIE DEREN KOPPLUNG MIT INSULIN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Hans-Gernot Biedermann

1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. Standl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Mehnert

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 31. 7. 78



Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Allgemeiner Teil	3
2.1. Radikalische Polymerisation	3
2.2. IR-Spektroskopie	5
2.3. KMR-Spektroskopie	6
2.4. Chemie des Insulins	7
2.4.1. Chemische und physikalische Eigenschaften	7
2.4.2. Struktur des Insulins	7
2.4.2.1. Primärstruktur	7
2.4.2.2. Sekundär- und Tertiärstruktur	8
3. Darstellung von Styrol-Acrylsäure-Copolymeren und deren Kopplung mit Insulin	9
3.1. Allgemeines	9
3.2. Darstellung eines wasserunlöslichen Copolymeren aus Acrylsäure und Styrol	9
3.3. Diskussion der Ergebnisse und Spektren	10
3.4. Aktivierung der Copolymeren	11
3.5. Kopplung der aktivierten Copolymeren mit Insulin	13
3.5.1. Reaktion des Insulins mit Citraconsäureanhydrid	13
3.5.2. Heterogene Reaktion der aktivierten Copolymeren mit Insulin	14
3.5.3. Abspaltung der Citraconsäure vom Insulin	14
3.6. Reinigung der Kopplungsprodukte	14
3.7. Diskussion der Ergebnisse	16
3.7.1. Untersuchungsmethoden	16
3.7.2. Ergebnisse und Diskussion	18
4. Darstellung von Styrol-Acrylsäurechlorid-Copolymeren und deren Kopplung mit Insulin	19
4.1. Darstellung der Copolymeren	19
4.2. Kopplung der Copolymeren mit Insulin	19
4.3. Ergebnis	20

5. Darstellung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon- (Acryloyl-2-Hydroxypyridin; Acryloyl-1,2,4-Triazol; Acryloyl-Succinimid)Copolymeren und deren direkte Kopp- lung mit Insulin	22
5.1. Problemstellung	22
5.2. Darstellung von Polyacrylsäurechlorid	22
5.3. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit Pyrrolidinon	22
5.4. Kopplung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon- Copolymer mit Insulin	24
5.4.1. Schützen der N-terminalen Aminosäuren mit Citracon- säureanhydrid	24
5.4.2. Kopplung des Copolymeren mit Insulin	24
5.4.3. Reinigung des Reaktionsproduktes	25
5.5. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit Succinimid, 2-Hydroxypyridin und 1,2,4-Triazol	25
5.6. Ergebnis	26
6. Darstellung von Metallkomplexen der mit komplexierenden Gruppen modifizierten Acrylsäurepolymeren	27
6.1. Problemstellung	27
6.2. Darstellung von Metallkomplexen mit Acrylsäure-Acryloyl- pyrrolidinon-Copolymer	27
6.3. Darstellung von Metallkomplexen mit Acrylsäure-Acryloyl- succinimid-Copolymer	29
6.4. Ergebnis	29
7. Diskussion	30
7.1. Diskussion der eigenen Ergebnisse	30
7.2. Diskussion der Literatur	32
7.2.1. Einleitung	32
7.2.2. Biosynthese und Sekretion des Insulins	33
7.2.3. Wirkungen des Insulins	34
7.2.3.1. Insulinwirkungen auf die Muskelzelle	34
7.2.3.2. Insulinwirkungen auf die Fettzelle	34
7.2.3.3. Insulinwirkungen auf die Leberzelle	35

7.2.4. Diabetes mellitus und Insulinwirkung	35
7.2.5. Insulin-Rezeptoren	36
8. Experimenteller Teil	38
8.1. Darstellung der Styrol-Acrylsäure-Copolymeren	38
8.1.1. Aktivierung der Copolymeren	38
8.1.2. Reaktion des Insulins mit Citraconsäureanhydrid	39
8.1.3. Kopplung des Insulins mit dem Styrol-Acrylsäure- Copolymeren in heterogener Reaktion	40
8.1.4. Abspaltung der Citraconsäure vom Insulin	40
8.2. Darstellung von Styrol-Acrylsäurechlorid-Copolymeren und deren direkte Kopplung mit Insulin	40
8.2.1. Darstellung von Acrylsäurechlorid (monomer)	40
8.2.2. Darstellung des Acrylsäurechlorid-Styrol-Copolymeren	41
8.2.3. Direkte Kopplung der Copolymeren mit Insulin	41
8.3. Darstellung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon (Acryloyl-2-Hydroxypyridin; Acryloyl-1,2,4-Triazol; Acryloyl-Succinimid)Copolymer und deren direkte Kopplung mit Insulin	41
8.3.1. Darstellung von Polyacrylsäurechlorid	41
8.3.2. Darstellung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon- Copolymer	42
8.3.3. Kopplung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon- Copolymer mit Insulin	43
8.3.4. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit 2-Hydroxy- pyridin	43
8.3.5. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit 1,2,4-Triazol	43
8.3.6. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit Succinimid	44
8.4. Darstellung von Metallkomplexen der mit komplexierenden Gruppen modifizierten Acrylsäurepolymeren	45
8.4.1. Metallkomplexe mit Acrylsäure-Acryloylpyrrolidinon- Copolymer	45
8.4.2. Darstellung der Metallkomplexe mit Acrylsäure- Succinimid-Copolymer	45

8.4.2.1. Mit $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	45
8.4.2.2. Mit $\text{Cu}(\text{acetat})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	45
8.4.3. Bestimmung des Metallgehalts in den Copolymer- komplexen durch komplexometrische Titration mit EDTA	46
8.4.3.1. Bleititration	47
8.4.3.2. Kupfertitration	47
8.4.3.3. Lanthantitration	47
8.4.3.4. Quecksilbertitration	47
9. Zusammenfassung	49
10. Literaturverzeichnis	53
Lebenslauf	58

1. Einleitung und Problemstellung

Das in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln des Pankreas gebildete Hormon Insulin besitzt in biologischen Geweben ein weites Wirkungsspektrum. Die Reaktionen, die es beeinflußt, reichen von Spontaneffekten und Beschleunigung von Membrantransporten bis zu Langzeitwirkungen auf die DNS- und RNS-Synthese im Zellkern ¹⁻⁴⁾. Trotz der großen Bedeutung und Anwendungsbreite des Insulins ist der Reaktionsmechanismus erst unvollkommen aufgeklärt ⁴⁾. Durch die Studien mit an Sepharose gekoppeltem Insulin ⁵⁾ schien der experimentelle Beweis für die extrazelluläre Wirkung von Insulin erbracht, jedoch konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Insulin an das Sepharose-Teilchen nicht genügend stabil war und während der Inkubation kontinuierlich "freies" niedermolekulares Insulin freigesetzt wurde ⁶⁾.

Kürzlich demonstrierten Goldfine et al. ⁷⁾, daß auch gereinigte Zellkerne Bindungsstellen für Insulin besitzen und postulierte aus kinetischen Messungen, daß das intakte Hormon in die Zelle aufgenommen wird ⁸⁾. Trotz dieser Daten ist der sichere experimentelle Beweis, daß Insulin in die Zelle eindringt, noch nicht erbracht.

Mit Hilfe von neuen wasserlöslichen und wasserunlöslichen Acrylsäurecopolymeren, an die Insulin gebunden ist, soll versucht werden, dieser Fragestellung nachzugehen.

Das Eindringen von Insulin in die Zelle kann verhindert werden, wenn Insulin an ein unlösliches Polymeres gekoppelt wird. Behält das Insulin seine biologische Wirksamkeit, so kann angenommen werden, daß es ausschließlich an der Zellmembran seinen Angriffsort hat. Wird andererseits Insulin an ein lösliches Polymeres, das außerdem noch chelatbildende Gruppen enthält, gebunden, so kann nach Reaktion des Insulins an oder in der Zelle der Wirkungsort nach Komplexierung der Chelat-Gruppe mit schweren Metallionen elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Acrylsäuregruppen bzw. Acrylsäurechloridgruppen in den Polymeren sollen die reaktiven Gruppen für die Bindung zum Insulin liefern.

Ziel dieser Arbeit soll es sein, grundlegende Untersuchungen über verwendungsfähige Polymere, die sämtlich den speziellen Anforderungen gemäß neu zu entwickeln sind, deren Kopplung an Insulin und, im Falle

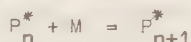
der löslichen Polymeren, deren Komplexierungsverhalten mit Metallionen, durchzuführen.

Zur Charakterisierung der erstmals darzustellenden Polymeren werden neben der Elementaranalyse auch die Infrarotspektroskopie und die Kernmagnetische Resonanzspektroskopie angewendet. Kurze Erläuterungen dieser Methoden sowie eine knappe Einführung in die radikalische Polymerisation sollen deshalb den eigenen Arbeiten vorangestellt werden.

2. Allgemeiner Teil

2.1. Radikalische Polymerisation 9-13)

Durch Polymerreaktionen können monomere Verbindungen mit reaktionsfähigen Doppelbindungen entweder spontan oder unter Einwirkung von Initiatoren in polymere Moleküle übergeführt werden. Das Wesentliche hierbei ist die Tatsache, daß es sich um eine Kettenreaktion handelt. Ist die Polymerisation einmal gestartet, so wächst das Polymermolekül bei jedem Reaktionsschritt um eine Monomereinheit.



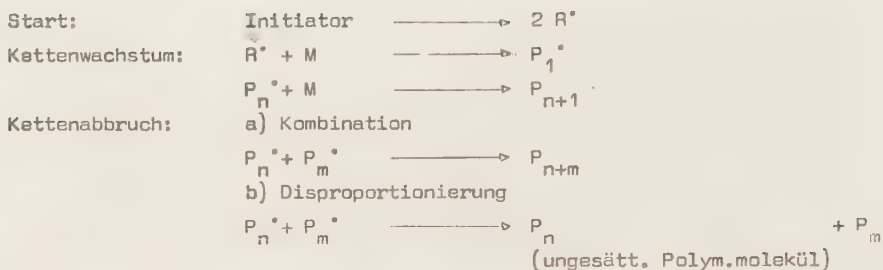
Nach diesem allgemeinen Schema verlaufen alle Polymerisationen, die radikalische, die ionische und die koordinative. Das Sternchen weist darauf hin, daß ein aktiver Zustand vorliegt, der sich während des Wachstums des Polymermoleküls jeweils auf das zuletzt eingebaute Monomere (M) überträgt. Die Zahl der unmittelbar aufeinanderfolgenden Wachstumsschritte und damit der Polymerisationsgrad n hängen von zahlreichen Faktoren ab:

1. vom Mechanismus der Polymerisation
2. von der Konzentration der Monomer- und Initiator-moleküle
3. von der Temperatur

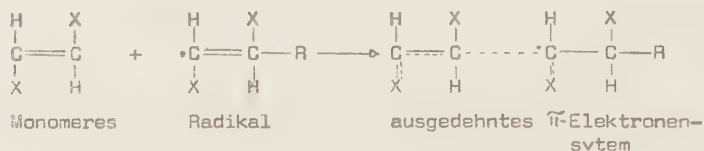
Daneben spielen auch noch Lösungsmiteleinflüsse eine Rolle. Von grundlegender Bedeutung sind auch die Reinheit der Ausgangsstoffe und die Sauberkeit der Reaktionsgefäße.

Im allgemeinen können auch zwei oder mehr Vinylpolymere durch Polymerisation in einer Kette vereinigt werden. Derartige Mischpolymerisate, auch Copolymere genannt, nehmen in ihren Eigenschaften eine Mittelstellung zwischen den beiden Homopolymeren ein. Die Copolymerisation ist also ein geeignetes Mittel, um die Eigenschaften von Makromolekülen in einer gewünschten Richtung zu modifizieren.

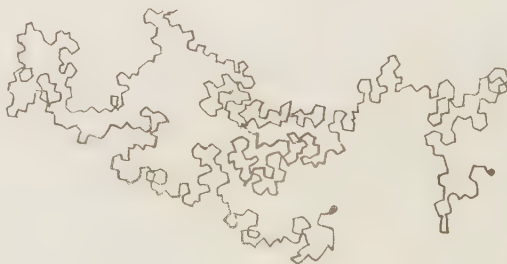
Die radikalische Polymerisation wird durch freie Radikale eingeleitet und über wachsende Makroradikale fortgepflanzt. Allgemein läßt sich folgendes Reaktionsschema formulieren:



Entscheidend für das Ablaufen der Polymerisation ist, ob die Initiatorradikale reaktiv genug sind, um auch wenig aktivierte Doppelbindungen angreifen zu können. Der Übergangszustand der Reaktion Monomermolekül - Polymerradikal wird durch das sogenannte " π -Extensionsmodell" beschrieben⁹⁾. Es geht davon aus, daß Monomeres und Radikal ein einziges ausgedehntes π -Elektronensystem bilden.



Der dabei auftretende Gewinn an Delokalisierungsenergie trägt nach dieser Theorie den entscheidenden Anteil zur Aktivierungsenergie bei. Lineare Makromoleküle haben keine exakt definierbare Gestalt, etwa die Form einer langgestreckten Kette (starres Stäbchen), oder die einer Kugel, sondern sie liegen - und das nur in hochverdünnten Lösungen in einem indifferenten Lösungsmittel - als statistisches Knäuel vor¹⁰⁾:



2.2. IR-Spektroskopie 14-17)

Die IR-Spektroskopie, die je nach dem verwendeten Prismenmaterial mit Infrarotstrahlung des Bereiches zwischen etwa 1 und 50 μ arbeitet, ist eine relativ einfache und schnelle Methode, zuverlässige Hinweise auf Struktur und Zusammensetzung einer Verbindung zu erhalten. Sie beruht auf Rotations- und Schwingungsübergängen der Moleküle. Unter den Schwingungen eines Moleküls versteht man grob die Bewegung seiner Atome um ihre Ruhelage, wobei der Gesamtschwerpunkt der Molekel nicht verschoben werden darf. Meist ist diese Bewegung von einer Rotation des gesamten Moleküls begleitet. Die Frequenzen dieser Schwingungen hängen von den Bindungskräften zwischen den einzelnen Atomen, den Atommassen und ihrer räumlichen Anordnung zueinander ab. Sie lassen sich daher auch aus diesen Größen berechnen. Andererseits kann man nun aus einem IR-Spektrum auf im Molekül vorhandene Bindungstypen schließen, da diese zu sehr spezifischen, innerhalb bestimmter und meist recht enger Wellenlängenbereiche auftretenden Absorptionsbanden führen. Valenzschwingungen funktioneller Gruppen sind dabei mit charakteristischen Banden in einem Bereich über 1500 cm^{-1} zu finden und können, da in diesem Bereich Überlagerungen unwahrscheinlich sind, ziemlich eindeutig zugeordnet werden. Die im sogenannten "finger-print"-Bereich von 1500 cm^{-1} bis 700 cm^{-1} auftretenden Ober- und Kombinationschwingungen können zu einem einfachen Nachweis der Identität bzw. Verschiedenheit zweier Verbindungen durch Vergleich ihrer "finger-print"-Spektralbereiche herangezogen werden. Dabei gilt allgemein: Je größer die gemessene Schwingungsfrequenz ist, um so größer ist die sie verursachende Bindungsstärke. Dreifachbindungen absorbieren daher bei höheren Frequenzen als Einfachbindungen. Die Schwingungen der Kohlenstoff-Wasserstoff-Bindungen liegen aufgrund der Beziehung

$$\nu \sim h \cdot \sqrt{\frac{x}{m}}$$

in Verbindung mit der relativ kleinen Atommasse des Wasserstoffs erst in sehr hohen Frequenzbereichen.

2.3. KMR-Spektroskopie 18-20)

Die von E.M. Purcell und F. Bloch im Jahre 1946 entdeckte, im Meterwellenbereich arbeitende Methode, beruht auf einer Umorientierung der magnetischen Kernmomente, also auf durch äußere nicht von vornherein im Molekül vorhandenen Magnetfeldern erzeugten Dipolübergängen. Daher sind die beobachteten Energiedifferenzen keine festen, sondern dem äußeren angelegten Magnetfeld proportionalen Größen. Voraussetzung für das Auftreten von Absorptionsbanden ist, daß der betrachtete Kern einen von Null verschiedenen Kernspin besitzt, in der vorliegenden Arbeit also ^1H .

In einem bei relativ schwacher Auflösung erhaltenen Spektrum erscheinen Banden, die jeweils chemisch und strukturell gleichen Protonen zuzuordnen sind. Diese Auftrennung in verschiedene Resonanzlinien der in verschiedener struktureller Umgebung stehenden und daher nicht äquivalenten Protonen wird als "chemische Verschiebung", englischsprachig als "chemical shift", bezeichnet. Die Flächen unter diesen Resonanzkurven sind der sie hervorrufenden Protonenzahl proportional.

Bei höherer Auflösung des Spektrographen erscheint eine sogenannte Hyperfeinstruktur, eine Auflösung jeder Resonanzlinie in weitere Einzelsignale, die auf Wechselwirkungen zwischen den Protonen benachbarter Gruppen untereinander zurückzuführen sind, d.h. man kann aus einem derartigen KMR-Spektrum auf die Struktur der zu untersuchenden Verbindung schließen.

Die Lage der Resonanzabsorptionslinien der Protonen in der zu untersuchenden Verbindung wird meist durch den δ -Wert bestimmt, der die chemische Verschiebung in ppm gegen die Lage der Resonanzabsorptionslinie der Protonen einer Bezugssubstanz, meist Tetramethylsilan, angibt. Daraus ist ersichtlich, daß diese Spektroskopiemethode heute immer häufiger zur Klärung der Konstitution und damit, wie in der vorliegenden Arbeit, zur Identifizierung organischer Verbindungen herangezogen wird.

2.4. Chemie des Insulins

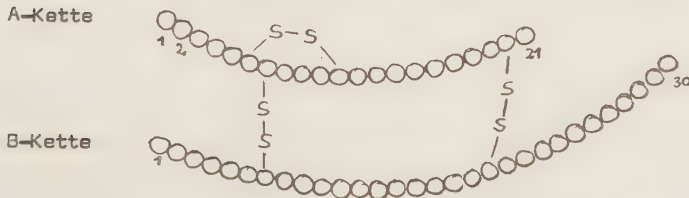
2.4.1. Chemische und physikalische Eigenschaften ⁴⁾

Insulin ist ein Protein und als solches hitze- und alkaliempfindlich. In stark saurer Lösung denaturiert es reversibel zu einer fibrillären Form, die biologisch unwirksam ist. Zwischen pH 4,3 und 6,8 ist Insulin schwer löslich; der isoelektrische Punkt liegt bei pH 5,3. Monomer besitzt Insulin ein Molekulargewicht, von ca. 6000, und ist somit definitionsgemäß noch ein Peptid. In seinem Aggregationsverhalten und der Denaturierbarkeit hat es jedoch typische Proteineigenschaften.

2.4.2. Struktur des Insulins

2.4.2.1. Primärstruktur

Als Primärstruktur eines Proteins oder Peptids bezeichnet man die Folge der Aminosäuren in der Kette. Die Aufklärung der Sequenz begann mit dem Nachweis der beiden N-terminalen Aminosäuren, Phenylalanin und Glycin, die in dieser Arbeit eine besondere Rolle spielen. Insulin besteht aus zwei Peptidketten, wobei die erste aus 21, die zweite aus 30 Aminosäuren aufgebaut ist.



2.4.2.2. Sekundär- und Tertiärstruktur 21)

Unter Sekundärstruktur versteht man die Faltung einer Peptidkette als Folge bindender Kräfte zwischen verschiedenen Abschnitten der Kette. Bei Insulin können etwa 50% der Aminosäurereste einer rechtsgängigen α -Helix zugeordnet werden; es zeigen jedoch nur etwa 20% der Reste Abstände, wie sie einer korrekten α -Helix entsprächen. Durch Ausbildung kovalenter Bindungen wie Disulfidbrücken, aber auch durch zwischenmolekulare Kräfte zwischen Bereichen, die durch größere Sequenzen getrennt sind, kann eine räumliche Lage stabilisiert werden, die als Tertiärstruktur bezeichnet wird. Solche Bindungen verknüpfen beim Insulin auch verschiedene Peptidketten miteinander; Cysteinreste bilden insgesamt drei Disulfidbrücken. Die spezifische Wirkung des Insulins verlangt ein relativ starres Molekül, da die für die Rezeptorbindung essentiellen Strukturen über die ganze Aminosäuresequenz verteilt sind.

3. Darstellung von Styrol-Acrylsäure-Copolymeren und deren Kopplung mit Insulin

3.1. Allgemeines

Zur Frage, ob Insulin bereits außerhalb der Zelle, an der Zellmembran, seine Wirkung entfaltet, sollen Untersuchungen an Insulin, das an spezielle Copolymere aus Styrol und Acrylsäure gebunden ist, einen Beitrag leisten. Da im Körper ein wäßriges "Reaktionsmedium" vorliegt, haben die herzustellenden Copolymeren vorwiegend aus Styrol zu bestehen, da Styrol im Gegensatz zu Acrylsäure wasserunlöslich ist.



Styrol

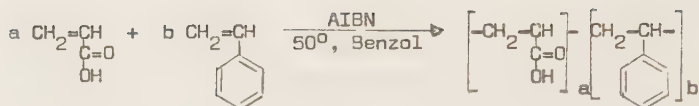


Acrylsäure

Dadurch kann verhindert werden, daß das gekoppelte Insulin in die Zelle eindringt. Auf Grund der extremen Unlöslichkeit dieser Polymeren kann auch auf eine nicht toxische Wirkung der Copolymeren geschlossen werden.

3.2. Darstellung eines wasserunlöslichen Copolymeren aus Acrylsäure und Styrol ^{22,23)}

Unter Abwesenheit von Sauerstoff und Feuchtigkeit werden Styrol und Acrylsäure in den Molverhältnissen 89% Styrol (95%) und 19% Acrylsäure (5%) mit AIBN als Starter in Benzol polymerisiert. Die Polymerisationen werden bei 50 °C durchgeführt, da bei noch höheren Temperaturen der Reaktionsablauf beschleunigt und dadurch nur kurzkettinge Endprodukte erhalten werden würden. Die Polymerisation läuft radikalisch ab mit Azoisobuttersäuredinitril als Starter.



Nach 7 (90) Stdn werden die Reaktionen abgebrochen, wobei stark vernetzte Endprodukte erhalten werden, die in Benzol nicht mehr löslich sind. Nach dem Abfiltrieren können die Copolymeren in Dioxan aufgenommen werden. Durch zweimaliges Sprühfällen in Wasser werden wasserlösliche Anteile abgetrennt, wobei Dioxan als Lösungsmittel dient. Zuletzt fällt man die Copolymeren in Hexan, um noch vorhandene niedermolekulare Anteile, die nicht wasserlöslich sind, zu entfernen. Nach dem Abfiltrieren können die restlichen Lösungs- mittelanteile im Hochvakuum entfernt werden.

3.3. Diskussion der Ergebnisse und Spektren

Nach den Fällungen in Wasser und Hexan liegen die Copolymeren als weiße, feinflockige und hydrophobe Substanzen vor, wodurch für die spätere Kopplung eine große Reaktionsoberfläche gewährleistet ist. Die Polymeren haben eine ataktische Struktur, da die Polymerisationen nicht stereoselektiv verlaufen. Dies ist für die angestrebten Untersuchungen allerdings ohne Bedeutung.

Zur Identifizierung der Produkte werden die ^1H -Kernresonanz- und die IR-Spektroskopie herangezogen. Als Lösungsmittel für die KMR-Spektroskopie dient deuteriertes Aceton (D_6 -Aceton), für die IR-Spektren werden die Proben in festem Zustand als KBr-Preßlinge vermessen.

Die KMR-Spektren zeigen ein breites Signal zwischen 1,3 und 1,9 ppm, das auf die Protonen der Polymerkette zurückzuführen ist.

Die Protonen des Benzolringes vom Styrol erscheinen in zwei breiten, ineinander übergehenden Absorptionen zwischen 6,5 und 7,4 ppm. Einen weiteren Aufschluß über die Zusammensetzung der Verbindungen - vor allem über die funktionellen Gruppen - geben die IR-Spektren. Tab. 1 zeigt eine Zusammenstellung der Wellenzahlen für die verschiedenen Absorptionsbanden.

Wellenzahl $[\text{cm}^{-1}]$	Art der IR-Schwingung
2920(s); 2880(m)	aliph. C-H Valenzschwingung
1495(s); 1450(s)	C-H Deformationsschwingung
3100-3040(s)	arom. C-H Valenzschw.
1140(m); 1060(w); 870(w)	arom. C-H Deformationsschw.
1600(m)	C=C Gerüstschw. des Benzolringes
755(s); 695(s)	monosubstituierter Benzolring
1740(m); 1705(s)	Säurefunktion der Acrylsäure

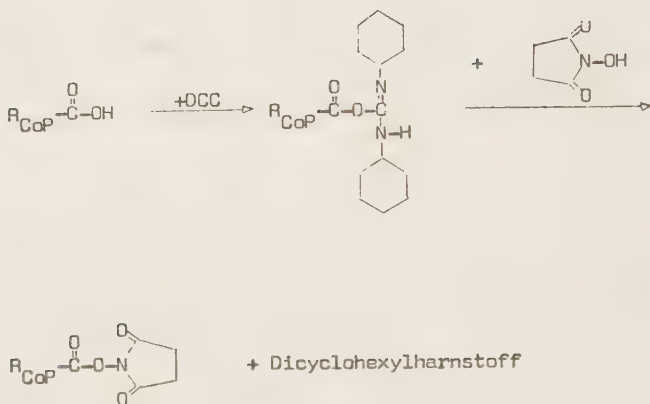
Tab. 1: IR-Absorptionen der synthetisierten Styrol-Acrylsäure-Copolymeren. s=stark; m=mittel; w=wenig

Die Elementaranalyse zeigt schließlich, daß unter den Versuchsbedingungen der beiden Ansätze 85:15 und 95:5 acrylsäurereichere Copolymere entstanden sind, nämlich 70:30 und 80:20.

3.4. Aktivierung der Copolymeren ^{24,25)}

Die Reaktionsfähigkeit der Acrylsäuregruppen der Copolymeren reicht für eine Kopplung des Insulins nicht aus. Sie kann aber über die chemische Aktivierung der Carboxylgruppen durch Veresterung mit N-Hydroxysuccinimid (HONSu) genügend erhöht werden. Dabei verestert man die Säuregruppen zuerst mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC), das dann sofort durch HONSu unter Freiwerden von Dicyclohexylharnstoff ersetzt wird. Die Reaktion findet bei Zimmertemperatur statt und

dauert ca. 24 Stdn.



Die Aktivierung kann in heterogener Reaktion in Essigsäureäthylester oder in Hexan erfolgen. Dadurch stehen nicht alle Acrylsäuregruppen für die Veresterung und die anschließende Kopplung mit Insulin zur Verfügung.

Da in Dimethylformamid die Copolymeren löslich sind, muß nach der Veresterung der Säuregruppen das Copolymere in Hexan gefällt werden.

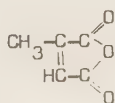
Die Aktivierung und Veresterung kann mit Hilfe der IR-Spektren gut verfolgt werden:

1780 cm^{-1}	-CON-CO- Valenzschwingung der Imidgruppe des N-Hydroxysuccinimids
1200, 1060 cm^{-1}	-C-O- Valenzschwingung der Esterbindung

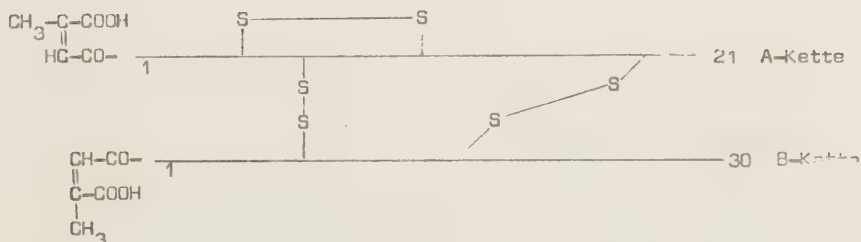
3.5. Kopplung der aktivierten Copolymeren mit Insulin

3.5.1. Reaktion des Insulins mit Citraconsäureanhydrid ²⁶⁾

Insulin besitzt drei Aminosäuren mit freien Aminogruppen, die für eine Bindung an die aktivierten Copolymeren in Frage kommen. Dazu gehören einerseits die beiden N-terminalen Aminosäuren Phenylalanin und Glycin, andererseits die Aminosäure 29 der B-Kette, Lysin. Da die beiden erstgenannten Aminosäuren wesentlich für die biologische Aktivität des Insulins mitverantwortlich sind, würde jede chemische Blockierung an diesen Stellen zum Verlust der biologischen Wirksamkeit des Hormons führen. Es müssen deshalb diese beiden Gruppen chemisch geschützt werden, bevor die eigentliche Kopplung erfolgt. Dies gelingt mit Citraconsäureanhydrid, das sich bei pH 7 bevorzugt mit den freien Aminogruppen des Phenylalanins und Glycins, im Gegensatz zur Aminogruppe des Lysins, verbindet.



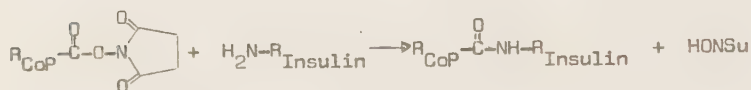
Citraconsäureanhydrid



Insulin mit citraconsäuregeschützten N-terminalen Aminosäuren

3.5.2. Heterogene Reaktion der aktivierten Copolymeren mit Insulin

Die wasserunlöslichen, aktivierten Copolymeren läßt man mit citraconsäuregeschütztem Insulin bei Raumtemp. in wäßrigem Medium mehrere Tage reagieren. Unter starkem Rühren verteilen sich die feinflockigen Copolymeren in der Lösung, wobei deren reaktive Estergruppen hydrophil sind und so die Bindung zum Insulin ermöglichen.



Kürzlich konnte gezeigt werden, daß ein nach dieser Methode synthetisiertes Polyvinylpyrrolidon-Insulin biologische und immunologische Aktivität besitzt ²⁷⁾.

3.5.3. Abspaltung der Citraconsäure vom Insulin ²⁴⁾

Nach Abbruch der Kopplungsreaktionen werden die Lösungen mit Hilfe von 0,1 n HCl auf pH 3,5 eingestellt. Bei diesem pH-Wert läßt sich die Citraconsäure innerhalb 36 Stdn wieder vom Insulin abspalten, ohne daß auf das Hormon ein wesentlicher negativer Einfluß erfolgt.

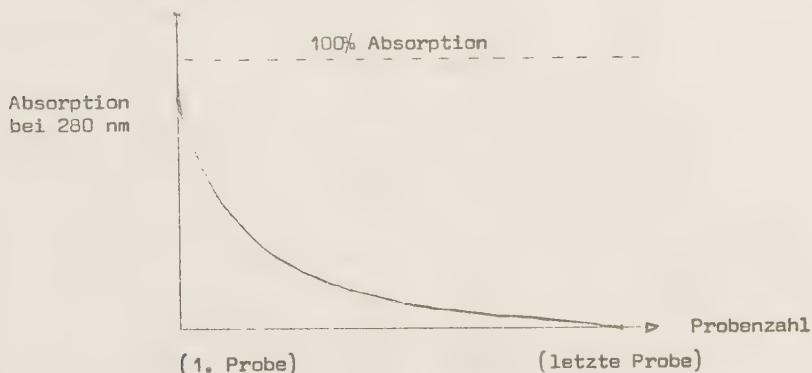
3.6. Reinigung der Kopplungsprodukte

Nach Beendigung der Kopplungsreaktion kann angenommen werden, daß ein Teil des Insulins an den Copolymeren lediglich adsorbiert und nicht chemisch gebunden ist. Um die spätere Untersuchungen nicht zu verfälschen, kann das adsorbierte Insulin mit 0,1 n NaHCO₃ bei pH 8,6 wieder entfernt werden, da bei diesem pH-Wert Insulin eine sehr gute Löslichkeit besitzt.

Zu den mit Insulin gekoppelten Copolymeren werden jeweils 10 ml 0,1 n NaHCO_3 gegeben. Anfangs wird das Lösungsmittel nach einer halben Stunde abfiltriert und erneuert. Später wird die Dauer der Waschungen auf drei bis 12 Std. ausgedehnt, da die Menge des adsorbierten Insulins bereits stark abgenommen hat.

Die Konzentration des Insulins in den einzelnen Waschungsproben kann mit Hilfe der UV-Spektroskopie einfach bestimmt werden.

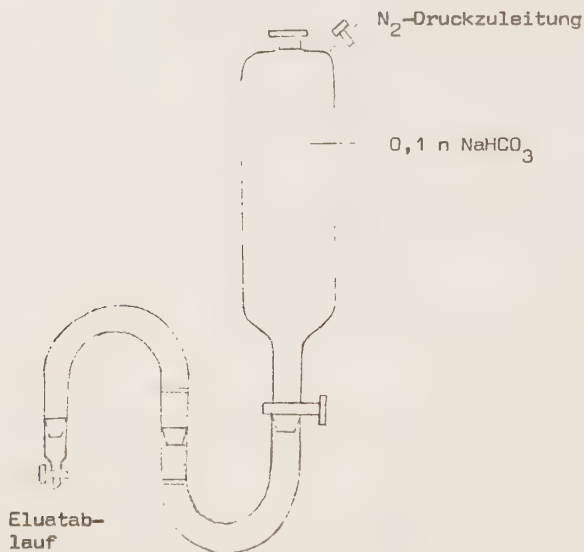
Bei 280 nm liegt das Absorptionsmaximum der Benzolringe der Phenylalanine und der Tyrosine des Insulins. Die Konzentrationen lassen sich graphisch erfassen, indem die Intensität der Absorption gegen die Anzahl der Proben aufgetragen wird.



Die Kurve fällt zuerst steil ab und nähert sich dann langsam dem Nullpunkt (optische Dichte = 0). Ist dieser schließlich erreicht, werden die Waschungen eingestellt, da innerhalb der Fehlergrenzen dieser Methode nur noch chemisch gebundenes Insulin an den Copolymeren vorzufinden ist. Es wurden bis zu 60 Einzelwaschungen pro Copolymeres durchgeführt.

Um mögliche Verunreinigungen bei den einzelnen Waschungsansätzen zu vermeiden, wurde für die weiteren Waschprozeduren eine besondere Waschanlage entwickelt, wobei das zu waschende Produkt zwischen zwei Glasfritten eingeschlossen wird. Das in den Glasbehälter eingefüllte 0,1 n NaHCO_3 wird mit Stickstoffdruck durch die Apparatur gespült,

währenddessen das Copolymere gewaschen wird. Von Zeit zu Zeit werden der langsam durchtropfenden Lösung Proben entnommen und im UV vermessen. Nach ca. 10 l 0,1 n NaHCO_3 ist der Nullpunkt der optischen Dichte erreicht.



schraffiert: Frittenbereich mit dem Copolymeren;
mittels Schliff zerlegbar.

3.7. Diskussion der Ergebnisse

3.7.1. Untersuchungsmethoden

Die Kopplungsprodukte werden auf das Vorhandensein von gebundenem Insulin und dessen Aktivität untersucht.

Das ans Copolymere gekoppelte Insulin wird hydrolytisch gespalten; die anfallenden Aminosäuren werden anschließend chromatographisch qualitativ und quantitativ nachgewiesen bzw. bestimmt.

Tab. 2 zeigt die Aminosäurezusammensetzung eines unlöslichen Kopplungsproduktes nach Hydrolyse mit 6n HCl, wie sie auch bei der Hydrolyse reinen Insulins zu erwarten ist.

Aminosäure	n Mol	Reste ⁺	Rinderinsulin
Asparaginsäure	42,0	2,8	3
Threonin	17,3	1,1	1
Serin	46,3	3,1	3
Prolin	14,1	0,9	1
Glutaminsäure	99,2	6,6	7
Glycin	66,4	4,4	4
Alanin	47,2	3,2	3
Valin	61,4	4,1	5
Cystin	—	—	6
Methionin	—	—	—
Isoleucin	12,0	0,8	1
Leucin	78,1	5,2	6
Tyrosin	48,3	3,2	4
Phenylalanin	41,8	2,8	3
Lysin	15,1	1,0	1
Histidin	27,4	1,8	2
Arginin	18,7	1,2	1

+ 15 nM = 1 Rest = 1 nMol Insulin

Tab. 2: Aminosäurezusammensetzung von polymer-gebundenem Insulin nach Hydrolyse mit 6n HCl bei 110 °C 28)

Um im Waschwasser noch ungebundenes Insulin nachzuweisen, bedient man sich immunologischer Tests, die um mehrere Zehnerpotenzen empfindlicher als die Messung der optischen Dichte sind. Die biologische Aktivität des gekoppelten Insulins schließlich kann mit Hilfe des Fettzelltests bestimmt werden. Dazu werden die

mit Insulin präparierten Copolymeren zu einer Fettzellsuspension gegeben, wobei die spezifischen Reaktionen des Insulins beobachtet werden.

3.7.2. Ergebnisse und Diskussion

Insulin konnte an die Copolymeren in geringer Menge (siehe experimenteller Teil) eindeutig gebunden werden. Der immunologische Test zeigte jedoch auch "lösliches Insulin" an.

Folgende Möglichkeiten kommen dafür in Betracht:

- a) "freies" Insulin war noch an den Copolymeren adsorbiert;
- b) relativ kurzkettige Polymermoleküle mit gebundenem Insulin haben sich allmählich gelöst;
- c) Insulin löst sich langsam aus seiner chemischen Bindung, d.h. es besteht ein deutliches chemisches Gleichgewicht der Insulin-Kopplungsreaktion.

Punkt a) und b) sollen mittels intensiven Reinigungsmethoden (Chromatographie) bei Kopplung in Lösung in organischen Lösungsmitteln und anschließender Versprühung in Wasser ausgeschlossen werden.

Punkt c) ist der limitierende Faktor aller dieser Versuche. Nur wenn die Gleichgewichtskonstante in der Nähe der Nachweisgrenze des immunologischen Tests, oder, mit anderen Worten, sehr klein ist, lassen sich mit den Kopplungsprodukten die anfangs geschilderten Untersuchungen zur Aufklärung des Wirkungsortes des Insulins überhaupt sinnvoll durchführen.

4. Darstellung von Styrol-Acrylsäurechlorid-Copolymeren und deren direkte Kopplung mit Insulin

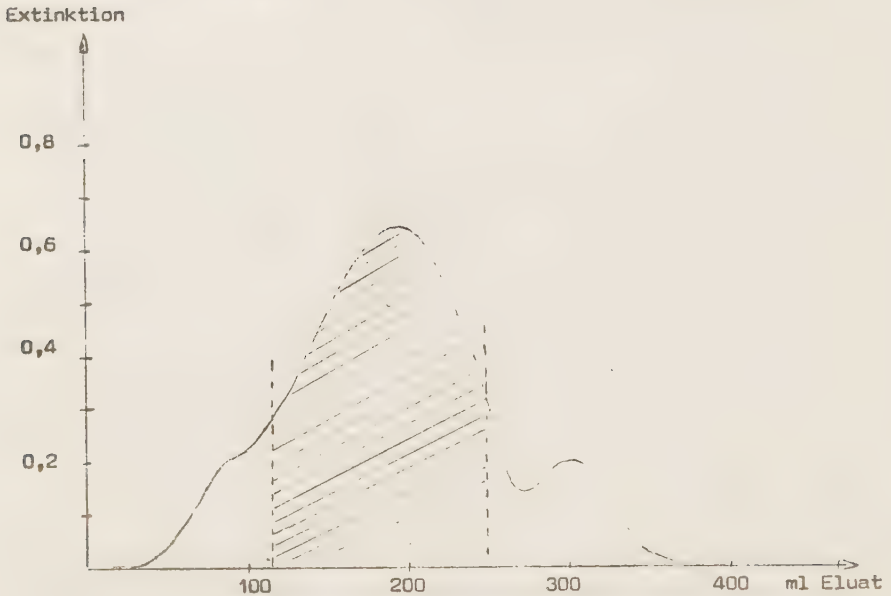
4.1. Darstellung der Copolymeren

Unter Stickstoffatmosphäre werden Styrol und Acrylsäurechlorid (Molverhältnis 89% : 19% bzw. 75% : 25%) in Benzol mit AIBN bei 50 °C polymerisiert. Nach Abbruch der Reaktion wird in Hexan gefällt und im Hochvakuum getrocknet. Die Elementaranalyse zeigt Copolymere an, die genau den eingesetzten Ausgangsmengen entsprechen.

4.2. Kopplung der Copolymeren mit Insulin

Da in diesen Copolymeren anstatt der Acrylsäuregruppen Acrylsäurechloridgruppen vorhanden sind, kann auf eine Aktivierung mittels DCC und HONSu verzichtet werden, denn die Säurechloridgruppierung steht in ihrer Aktivität noch weit über der aktiven Estergruppierung. Die Kopplung mit citraconsäuregeschütztem Insulin kann also direkt in Dimethylformamid innerhalb zwei Stdh geschehen.

Nachdem die Kopplung im Gegensatz zu der vorher beschriebenen heterogenen Kopplungsreaktion in Lösung stattgefunden hat - sie verläuft damit in einer "glatteren" Reaktion - kann auch eine wesentlich bessere Reinigung des Reaktionsproduktes durchgeführt werden. Nach Abspalten der Citraconsäure wird das gelöste Kopplungsprodukt mehrmals über eine Sephadex (LH-20) Säule chromatographiert. Dabei wird bei jeder Chromatographie die Extinktion gegen die Menge an Eluat aufgetragen.



Da es sich um eine Gelchromatographie handelt, erscheinen die langkettigen Anteile zuerst, d.h. freies Insulin ist an einer Bande oder Schulter nach der Hauptbande zu erkennen. Dieser Anteil der aufgefangenen Proben sowie die Proben gleich zu Anfang der Hauptbande (senkrechte gestrichelte Linien in der Abbildung) werden verworfen. Die Proben des schraffierten Bereiches werden rechromatographiert. Es wird analog verfahren bis keine Asymmetrie der Bande mehr nachweisbar ist.

4.3. Ergebnis

Die Menge des gekoppelten Insulins ist durch den Angriff der äußerst

reaktiven Acrylsäurechloridgruppen wesentlich vergrößert worden. Der immunologische Test zeigt jedoch, trotz der ausgesprochen sorgfältigen und gründlichen Reinigungsprozeduren eine geringfügige Abspaltbarkeit des Insulins. Damit scheint doch Punkt c) von 3.7.2. der limitierende Faktor dieser Kopplungsreaktion zu sein.

5. Darstellung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-(Acryloyl-2-Hydroxypyridin; Acryloyl-1,2,4-Triazol; Acryloyl-Succinimid)Copolymeren und deren direkte Kopplung mit Insulin

5.1. Problemstellung

Im zweiten Teil der Arbeit werden wasserlösliche Copolymere beschrieben, die neben den reaktiven Säurechloridgruppierungen für die direkte Kopplung zum Insulin noch chelatisierende Gruppen enthalten. Mit Hilfe solcher Copolymeren soll es einmal ermöglicht werden, Insulin an seinem Wirkungsort (Zellmembran, Zellinneres, Zellkernmembran) nach Komplexierung der chelatisierenden Gruppen mit Metallionen elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen.

5.2. Darstellung von Polyacrylsäurechlorid ²⁹⁾

Die Polymerisation wird mit AIBN in absol. Dioxan als Lösungsmittel durchgeführt. Die Reaktionskomponenten werden dabei unter N_2 -Gasatmosphäre in Ampullen eingeschmolzen. Nach ca. 2 Tagen Reaktionsdauer sind visköse Lösungen entstanden, aus denen durch Fällung in Hexan das sehr feuchtigkeitsempfindliche Polymere isoliert wird. Die mittlere Molmasse beträgt ca. 35 000. Das Polymere kann mit Hilfe der IR-Spektroskopie identifiziert werden (in cm^{-1}):

2930(m), 2960(m)	C-H Valenzschwingungen
1785(s)	-CCl=O Valenzschwingung
1450(m)	C-H Deformationsschwingung

5.3. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit Pyrrolidinon ³⁰⁾

In Dioxan gelöstes Acrylsäurechlorid reagiert unter Stickstoffatmosphäre bei Raumtemperatur mit Pyrrolidinon.

Da für die Kopplung des Insulins noch genügend Säurechloridgruppen vorhanden sein müssen, werden nur ca. 40% der Chloridgruppen durch Pyrrolidinon ersetzt. Wegen der Bildung von Pyrrolidinonsalzen,

weitere Hydrolyse nicht mehr zuläßt.

Bei pH 7 (mit NaHCO_3 eingestellt) ist das Polymere gut löslich.

IR-Spektren (in cm^{-1}):

1795(s)	-COC1	Valenzschwingung (C=O); Schulter
1730(s)	-COOH	Valenzschwingungen bereits hydroly- sierter Säurechloridgruppen
1680(s)	=NCO-	Valenzschwingung; tertiäres Amid

5.4. Kopplung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copoly- meren mit Insulin

5.4.1. Schützen der N-terminalen Aminosäuren mit Citraconsäure- anhydrid ²⁶⁾

Die N-terminalen Aminosäuren Phenylalanin und Glycin des Insulins werden in wäßriger Lösung mit Citraconsäureanhydrid blockiert (siehe 3.5.1.). Nach Beendigung der Reaktion wird das Wasser abgezogen und das Insulin 12 Std im Hochvakuum getrocknet. Dieser Schritt ist für die nachfolgende Kopplung notwendig, da die Säurechloridgruppen, über die Insulin unter Chlorwasserstoffabspaltung gebunden wird, eine hohe Feuchtigkeitsempfindlichkeit zeigen.

5.4.2. Kopplung des Copolymeren mit Insulin

In Dimethylformamid werden citraconsäuregeschütztes Insulin und das Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copolymere bei Raumtemperatur umgesetzt.

Nach der Kopplungsreaktion werden die überschüssigen Säurechloridgruppen durch Zugabe von Wasser zur DMF-Lösung hydrolysiert. Durch Zugabe von 0,1n NaHCO_3 -Lösung bis pH 7 bleibt das Reaktionsprodukt in Lösung. Dieses Gemisch kann nun mit 0,1n HCl auf pH 3,5 eingestellt werden, um die Citraconsäure zu entfernen.

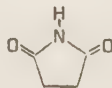
5.4.3. Reinigung des Reaktionsproduktes ^{31,32)}

Die Reinigung erfolgt durch mehrmalige Säulenchromatographie (Gelchromatographie mit Biogel) in saurer wäßriger Lösung (siehe 4.2.). Dabei wählt man zweckmäßigerweise Polyacrylamid als Gel, das für Moleküle nach zunehmender Größe bevorzugt durchlässig ist.

Nach Zugabe des gelösten Kopplungsproduktes muß eine möglichst langsame Tropfgeschwindigkeit eingestellt werden, um eine optimale Trennung der Bestandteile zu erreichen. Proben mit jeweils 10 ml werden anschließend im UV bei 280 nm gemessen, um das Copolymere mit dem daran gebundenen Insulin zu identifizieren.

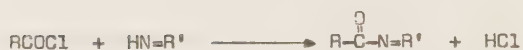
5.5. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit Succinimid, 2-Hydroxypyridin und 1,2,4-Triazol

Gleiche Reaktionsbedingungen wie unter 5.3. führen mit der entsprechenden Menge Succinimid



zu einem Copolymeren mit ca. 75% Umsatz der vorhandenen Säurechloridgruppen. Es muß dabei wieder beachtet werden, daß die Hälfte des eingesetzten Succinimids infolge Salzbildung der gewünschten Reaktion entzogen wird, d.h. es muß die doppelte Menge Succinimid eingesetzt werden.

Umsetzungen mit 2-Hydroxypyridin bzw. 1,2,4-Triazol als Reaktionspartner gelingen auf die gleiche Weise.



Die Kopplung mit Insulin und die anschließende Reinigung erfolgt analog der Beschreibung unter 5.4.1., 5.4.2. und 5.4.3.

Bei Verwendung von Succinimid konnte die beste Löslichkeit in wäßriger Lösung von mit Insulin gekoppelten Polymeren gefunden werden.

5.6. Ergebnis

Es gelang völlig neue Copolymere, ausgehend von Polyacrylsäurechlorid, darzustellen, die neben ausgesprochen reaktionsfreudigen Säurechloridgruppen noch chelatisierungsfähige Reste enthalten. Die Kopplung mit Insulin konnte ebenfalls eindeutig durchgeführt werden. Die gekoppelten Polymere sind nicht allzulange lagerungsfähig, da sie infolge von Vernetzungsreaktionen und allgemeiner Alterung langsam ihre Löslichkeit in Wasser verlieren.

6. Darstellung von Metallkomplexen der mit komplexierenden Gruppen modifizierten Acrylsäurepolymeren

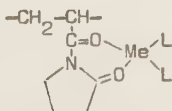
6.1. Problemstellung

Unter 5.1. wurde kurz ausgeführt, daß Insulin durch die Komplexbildung der Chelatgruppen der Polymeren an seinem Wirkungsort elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden soll. Dazu ist es notwendig, Komplexe mit Metallen darzustellen, die eine große Elektronendichte aufweisen, was eine elektronenoptische Fixierung erleichtert.

Als grundlegende Arbeit dazu ist es nötig, die koordinierenden Eigenschaften der dargestellten Copolymeren zu untersuchen, d.h. in den "Griff" zu bekommen.

6.2. Darstellung von Metallkomplexen mit Acrylsäure-Acryloylpyrrolidinon-Copolymer

Die Polyacryloylpyrrolidinonkomponente des Acrylsäure-Acryloylpyrrolidinon-Copolymeren kann über zwei Carbonylgruppen eine Chelatbindung an Metallionen eingehen:



Bei Einwirkung von Wasser auf das Copolymere werden die Säurechloridgruppen verseift, wodurch ein sehr niedriger pH-Wert entsteht. Da dies aber, wie schon erwähnt, zur Unlöslichkeit des Copolymeren führt, wird mit Hilfe von 0,1n NaHCO₃ pH 7 eingestellt und gehalten, wodurch das Copolymere innerhalb kurzer Zeit völlig in Lösung geht.

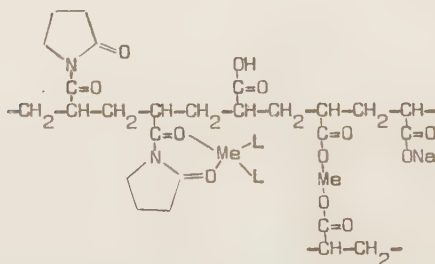
Dazu werden tropfenweise folgende Metallsalzlösungen gegeben:

$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$; $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{La}(\text{NO}_3)_2$.

Das Molekulargewicht des Copolymeren beträgt 280. Vom Kupferacetat, Quecksilbernitrat und Lanthannitrat wird jeweils ein kleiner Überschuß, vom Bleinitrat die doppelte Menge des Molekulargewichts eingesetzt. Die ausfallenden Metall-Polymerkomplexe sind wasserunlöslich und werden abfiltriert, gewaschen und getrocknet.

Die Metalle können einerseits über die Chelate des Polymeren gebunden sein, andererseits aber auch über die Sauerstoffatome zweier benachbarter Säuregruppen. Im zweiten Fall besitzt das Metall keine vom Metallsalz herrührenden Liganden. Da in der Reaktionslösung durch Zugabe von 0,1n NaHCO_3 -Lösung Na^+ -Ionen vorhanden sind, findet auch die Bildung von Natriumcarboxylat statt.

Aufgrund der C, H, N und Metallanalyse läßt sich die Zusammensetzung der Komplexe weitgehend berechnen. Dabei zeigt sich, daß etwa die Hälfte der Chelate des Kupferkomplexes mit Kupferacetat besetzt sind. Die restlichen 50% Kupfer sind über zwei benachbarte Säuregruppen als Carboxylationen gebunden. Etwa 29% der noch vorhandenen Säuregruppen liegen als Natriumcarboxylat vor.



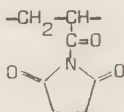
Bei den Komplexen mit $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ und $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ist der Anteil der chelatgebundenen Metallionen geringer, er liegt bei ca. 20%. Die restlichen 80% der Metalle sind wieder über Carboxylatgruppen gebunden.

Im Lanthankomplex sind nur knapp 10% des Lanthans über die Pyrrolidinongruppe gebunden; über 90% von Carboxylgruppen.

6.3. Darstellung von Metallkomplexen mit Acrylsäure-Acryloylsuccinimid-Copolymer

Analoge Reaktionsbedingungen liefern mit Acrylsäure-Acryloylsuccinimid-Copolymer und Kupfer(II)acetat mit Kupfer besetzte Succinimidgruppen und Carboxylatgruppen zu etwa gleichen Anteilen.

Mit BaCl_2 ist das Verhältnis 35:65 und mit $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ 20:80 zu Gunsten der carboxylatgebundenen Anteile.



6.4. Ergebnis

Die koordinierenden Eigenschaften der beiden Copolymeren mit Pyrrolidinon bzw. Succinimid als Chelatgruppierungen wurden untersucht. Es wurden dazu verschiedene Metallkomplexe erstmals synthetisiert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, daß die Metallionen in den Komplexen keinesfalls nur an den Chelaten vorzufinden

sind, sondern sie bilden mit den Säuregruppen auch Salze aus. Für die Verwendung als "Indikator" ist dies belanglos, denn dabei geht es um die Anwesenheit der Metalle überhaupt, ganz gleich durch welche Art der Bindung dies bewerkstelligt wird.

7. Diskussion

7.1. Diskussion der eigenen Ergebnisse

Die Aufgabenstellung war:

- a) wasserunlösliche Polymere zu synthetisieren und Insulin chemisch daran zu binden;
- b) wasserlösliche Polymere zu synthetisieren, an die ebenfalls Insulin chemisch gebunden werden soll, die aber darüber hinaus chelatbildende Gruppen enthalten;
- c) die Polymeren aus Gruppe b) sollen im Hinblick auf ihre koordinierenden, d.h. komplexbildenden Eigenschaften hin untersucht werden.

Ad a): Es wurden hochvernetzte Acrylsäure-Styrol-Copolymere mit hohen Styrolanteilen dargestellt. Die Kopplung an Insulin (ε -Aminogruppe des Lysins) wurde über die bekannte Aktivierungsreaktion mit DCC und N-Hydroxysuccinimid in heterogener Reaktion bewerkstelligt. Die N-terminalen Aminogruppen des Insulins wurden mit Citraconsäure geschützt.

Der Anteil des gekoppelten Insulins war dabei relativ gering, wobei noch adsorbiertes freies Insulin an den Polymermolekeln vorhanden war, das trotz langwieriger Waschungen nicht zu entfernen war.

Die Kopplung und anschließende Reinigung wurde deshalb in Dimethylformamid durchgeführt; anschließend wurde das Reaktionsprodukt in Wasser versprüht. Um die Menge an chemisch gebundenem Insulin zu erhöhen, wurde ein neues Copolymeres mit Acrylsäurechlorid anstatt Acrylsäure synthetisiert. Die Kopplung konnte nun direkt über die Acrylsäurechloridgruppen erfolgen. Das Reaktionsprodukt wurde zur Reinigung mehrmals über eine Sephadex-Säule geschickt.

Diesmal gelang es, eine wesentlich größere Menge Insulin chemisch zu binden, allerdings konnte nicht verhindert werden, daß immer noch

etwas freies Insulin nachzuweisen ist. Man kann annehmen, daß die Gleichgewichtsreaktion



nicht völlig auf der linken Seite liegt, sondern doch in nachweisbarem Maße nach rechts geht. Dies kann auch für das bereits publizierte Sepharose-Insulin angenommen werden ⁶⁾.

Daß die Lage des Gleichgewichts der entscheidende Faktor sein wird, war vorauszusehen. Dem wurde dadurch Rechnung getragen, indem der Styrolanteil sehr hoch gewählt wurde. Zum einen war dadurch eine verstärkte Wasserunlöslichkeit erreichbar, zum anderen sollten die Säurechloridgruppen und damit natürlich auch die Säureamidgruppen nach der Bindung zum Insulin, gleichsam in eine Tasche aus Styrol-einheiten "gebettet" werden, wodurch derartige Hydrolyseerscheinungen durch das umgebende hydrophobe Styrol verhindert werden sollte. Der Styrolanteil mußte demnach noch weiter erhöht werden. Dadurch wird allerdings auch die Reaktionsbereitschaft zu einer Bindung ans Insulin geringer. Da die Abspaltbarkeit des Insulins bei den in dieser Arbeit erstmals synthetisierten Copolymeren nicht sehr groß war, kann angenommen werden, daß durch Erhöhung des Styrolanteiles auf etwa 97-99% doch noch eine Zurückdrängung dieser "Insulinabspaltreaktion" in eine Größenordnung, die sich der immunologischen Nachweismethode entzieht, erlangt werden kann.

Sämtliche neu dargestellten Polymere wurden IR- und KMR-spektroskopisch sowie elementaranalytisch untersucht und charakterisiert.

Ad b): Wasserlösliche Polymere mit chelatisierenden Gruppen wurden wieder auf Acrylsäurebasis synthetisiert. Polyacrylsäurechlorid wurde mit Pyrrolidinon (2-Hydroxypyridin, Succinimid, 1,2,4-Triazol) umgesetzt, so daß etwa 40-75% der Säurechloridgruppen für Bindungen an das jeweils eingesetzte chelatisierende Agens "verbraucht" wurden. Einige Säurechloridgruppen wurden für die direkte Kopplung zum Insulin verwendet und die restlichen Gruppen wurden zu Acryl-

säure hydrolysiert, was die Wasserlöslichkeit weiter erhöhte. Es ließen sich auf diese Weise die gewünschten Kopplungsprodukte gut darstellen. Die Wasserlöslichkeit war besonders beim Succinimidderivat im frisch dargestellten Zustand sehr gut. Diese Löslichkeit nimmt jedoch relativ schnell ab. Die dargestellten Polymere konnten ebenfalls wieder spektroskopisch und analytisch sicher charakterisiert werden.

Ad c): Das Komplexierungsverhalten der Polymeren aus b) wurde an einigen Metallsalzen untersucht. Metallkomplexe mit Polymeren als Liganden wurden erst in den letzten Jahren eingehend erforscht³³⁻³⁵⁾, demnach ein noch ziemlich junges und weites Forschungsgebiet. Es zeigte sich, daß je nach eingesetztem Metall, die Anteile chelatgebundenen Metalls (an der speziell ins Polyacrylsäurechlorid eingebauten Chelatgruppe) zu carboxylatgebundenen Metalls stark variierten. Dies ist allerdings mehr oder weniger nur von akademischen Interesse, denn für die Verwendung der metallhaltigen Polymeren als Indikator für den Insulinangriff an oder in der Zelle ist die Art der Bindung ans Polymere von untergeordneter Bedeutung.

7.2. Diskussion der Literatur

7.2.1. Einleitung

Die Zuckerkrankheit, an der bei uns etwa 3% der Bevölkerung leiden, wird hauptsächlich durch Insulinmangel verursacht⁴⁾. Das Hormon Insulin wird in den β -Zellen der Langerhansschen Inseln im Pankreas gebildet. Der Zusammenhang zwischen Diabetes mellitus und Pankreas war aus Experimenten von v. Mehring und Minkowski deutlich geworden, die bei pankreatektomierten Hunden alle Zeichen der Zuckerkrankheit erkannt hatten³⁶⁾. Auf Minkowski geht auch die entscheidende Beobachtung zurück, daß pankreatektomierte Hunde nicht diabetisch werden, wenn man ihnen kleine Pankreasstückchen unter die Haut implantiert.

Schon in den Jahren 1902 - 1914 beschäftigte man sich mit Versuchen zur Extraktion des Insulins aus Pankreas³⁷⁻³⁹⁾, doch erst 1921 waren Banting und Best endgültig erfolgreich⁴⁰⁾. Damit war die Grundlage für die medizinische Anwendung des Hormons und für die Beschäftigung mit der chemischen Natur dieser Substanz geschaffen.

7.2.2. Biosynthese und Sekretion des Insulins

In den β -Zellen der Langerhansschen Inseln wird Insulin nach den Gesetzen der Proteinbiosynthese an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Steiner et al.⁴¹⁾ zeigten, daß Insulin in Form einer einzigen Polypeptidkette als Prohormon Proinsulin mit je nach Species insgesamt 81 bis 86 Aminosäuren synthetisiert wird. Nach Ausbildung der Disulfidbrücken wird daraus durch spezifische proteolytische Enzyme ein Verbindungspeptid (Connecting-Peptid) abgespalten, wobei dann das biologisch aktive Insulinmolekül entsteht. Proinsulin besitzt eine geringe biologische Aktivität, kann jedoch mit Insulinantikörpern kreuzreagieren.

Die Inkubation von Proinsulin mit Pankreastrypsin führt zur Entfernung des C-Peptids und damit zur Freisetzung eines biologisch voll aktiven Produkts. Die Spaltung ist jedoch nicht genau, da das Spaltungsprodukt nach Trypsinbehandlung nicht Insulin, sondern ein um einen Alaninrest verkürztes Insulinmolekül (desalanisiertes Insulin) ist. Demzufolge ist für die biologische Aktivierung von Proinsulin zu Insulin zwar ein proteolytischer Vorgang erforderlich, der aber unter Katalyse eines anderen Enzyms als Trypsin (oder mehrerer Enzyme) abläuft.

Nach der Umwandlung bildet Insulin in Gegenwart von Zink Aggregate. Dabei entstehen die typischen β -Granula.

Die Freisetzung von Insulin aus der β -Zelle ist an die Gegenwart von Calciumionen gebunden^{42,43)}.

Als Stimulatoren der Insulinsekretion scheinen neben der Glucose die Aminosäuren - insbesondere die verzweigtkettigen Leucin, Valin, Isoleucin sowie Lysin, Arginin, Methionin und Phenylalanin -

die wichtigste Rolle zu spielen ⁴⁴⁾. Auch Metalle beeinflussen die Insulinsekretion: Eine Erniedrigung des Kaliumspiegels hemmt die Sekretion ^{42,43)}.

7.2.3. Wirkungen des Insulins

7.2.3.1. Insulinwirkungen auf die Muskelzelle

Insulin aktiviert den Glucose-Transport durch die Membran von Muskel- und Fettzellen; dabei handelt es sich um einen Prozeß, der als "facilitated diffusion" oder "carrier transport", bezeichnet wird. Der durch Insulin gesteigerte Glucosetransport führt nicht zu einem Anstieg der intrazellulären Glucosekonzentration im Muskel, da unter physiologischen Bedingungen die Aktivität der Hexokinase größer als die Transportkapazität des Carriers für Glucose ist. Die eintretende Glucose wird hauptsächlich als Glykogen gespeichert.

Auf der Ebene der Ribosomen fördert Insulin den Einbau von Aminosäuren in Proteine.

7.2.3.2. Insulinwirkungen auf die Fettzelle

Mittels Carrier-Transport (siehe 7.2.3.1.) gelangt Glucose in die Fettzelle. Über die Einschleusung in den Pentose-Phosphat-Abbauweg werden die für die Fettsäuresynthese notwendigen Reduktionsäquivalente gebildet. Durch die gleichzeitige Steigerung der dehydrierenden Decarboxylierung von Pyruvat wird der für die Fettsäurebiosynthese erforderliche Kohlenstoff bereitgestellt.

Insulin führt nicht nur zu einer deutlichen Stimulierung der Lipogenese, sondern hemmt auch die hydrolytische Spaltung der gespeicherten Triglyceride zu Glycerin und freien Fettsäuren; es resultiert eine erhöhte Fettspeicherung in der Fettzelle.

7.2.3.3. Insulinwirkungen auf die Leberzelle

Eine ganz besondere Rolle in der Glucose-Homeostase spielt die Leber. Die Leberzellmembran ist frei permeabel für Glucose, so daß die Glucosekonzentration intrazellulär ungefähr gleich hoch wie im Plasma ist.

Im Gegensatz zur Muskulatur und zum Fettgewebe kann also Insulin nicht den Glucose-Eintritt in die Zelle regulieren, sondern muß an einem anderen Schritt regulierend eingreifen. Der nächste Schritt nach dem Eintritt der Glucose in die Zelle ist deren Phosphorylierung (Glucose-6-Phosphat), die in der Leber mittels des Enzyms Glucokinase erfolgt, so daß schließlich Glucose als Glykogen gespeichert werden kann. Entscheidend für die Glykogensynthese in der Leber sind die Aktivitäten der Glucokinase und der Glykogensynthetase. Diese beiden Enzyme stehen unter dem Einfluß von Insulin. Gleichzeitig wird der Glykogenabbau über eine Inaktivierung der Glykogen-Phosphorylase gehemmt. In Summa erfolgt also eine Speicherung von Glucose in der Leberzelle in Form von Glykogen.

Wie in Muskel- und Fettzelle stimuliert Insulin den Einbau von Aminosäuren in Proteine.

7.2.4. Diabetes mellitus und Insulinwirkung

Über die Entstehung des Diabetes weiß man wenig. Mit der Erkrankung ist die Unfähigkeit der β -Zellen verbunden, Insulin überhaupt, oder in ausreichenden Mengen abzugeben. Als Ursache werden genetische Faktoren und beim juvenilen Diabetes zusätzlich Folgen einer Virus-erkrankung diskutiert. Darüber hinaus spielen vor allem beim Erwachsenen-Diabetes verschiedene exogene Einflüsse eine manifestationsfördernde Rolle.

Bei einer sehr seltenen Form des Diabetes (Diabetes bei Acanthosis nigricans) ist zwar genug Insulin, meist sogar ein großer Überschuß vorhanden, die Wirkung an den Zellen der Zielorgane des Insulins ist jedoch infolge von Autoantikörper gegen die Hormonrezeptoren ⁴⁵⁾ blockiert.

Insulinmangel führt zu einem Anstieg des Glucosegehalts im Blut

und bei Überschreiten der "Harnschränke" (in der Regel bei 160-180 mg%) zum Auftreten von Glucose im Urin.

Der Abbau von Glykogen und Neutralfett ist erhöht. Aus der Lipolyse stammen die Ketonkörper, die bei schwer entgleistem Diabetes im Urin gefunden werden. Auch Eiweiß wird verstärkt abgebaut, was an der Erhöhung des Stickstoffgehalts im Harn erkennbar ist.

7.2.5. Insulin-Rezeptoren

Insulin kann, wie alle anderen Hormone auch, seine Wirkung an der Zelle erst dann entfalten, wenn es über spezifische Rezeptoren, die an der Plasmamembran lokalisiert sind, gebunden wird ^{46,47}). Diese Rezeptoren, bestehend aus Proteinen oder Glycoproteinen, sind also in der Lage, Insulin zu erkennen und zu binden ⁴⁸). Es ist dabei jedoch nicht bekannt, ob Insulin seine Wirkung nur von der Außenseite der Zelle aus steuert. In Kap. 1. wurde bereits auf dieses Problem, das für die vorliegende Arbeit themagebend war, unter anderem mit einem Hinweis auf das Sepharose-Insulin, kurz eingegangen.

Die Bindung Insulin - Rezeptor zeigt bei steigendem Insulingehalt ein gegenläufiges Verhalten, d.h. eine zunehmende Anzahl von Insulin-Rezeptor-Komplexen vermindert die Bindungsaffinität der noch unbesetzten Rezeptoren ⁴⁹), wobei eine Dimerisation von Insulin ausgeschlossen werden konnte ⁵⁰).

Untersuchungen an genetisch fettsüchtigen Mäusen (obese hyperglycemic mouse), an der New Zealand Obese Mouse und an der KK-Maus zeigten ein sehr geringes Bindungsvermögen von Insulin an den Ziel-Zellen ⁵¹⁻⁵⁴). Hyperinsulinismus und Insulinresistenz korrelieren mit einer Verminderung an Insulinrezeptoren. Ein analoges Verhalten konnte bei fettleibigen insulinresistenten Patienten gefunden werden ^{55,56}). Ganz anders ist die Situation bei den chinesischen Hamstern, die infolge β -Zellinsuffizienz diabetisch sind. Die Membranen der Insulin-Zielzellen besitzen eine erhöhte Anzahl von Rezeptoren ⁵⁷),

die nach Insulinbehandlung stark abnimmt. Dieses Phänomen der schnellen, gegenläufigen Einstellung Rezeptoranzahl - Insulinkonzentration konnte auch experimentell bestätigt werden ⁵⁸⁻⁶⁰).

Auf welchem Wege ist nun die Insulin - Rezeptor - Wechselwirkung in der Lage, die Zellvorgänge in einer gewünschten Weise zu steuern? Butcher et al. fanden eine Antwort mit ihrer Beobachtung, daß Insulin einen, in Anwesenheit von katabolen Hormonen erhöhten c-AMP-Spiegel in Fettzellen senken kann ⁶¹). Es konnte auch experimentell gezeigt werden, daß Insulin, ganz ähnlich wie Propranolol, die catecholaminstimulierte Adenylatcyclase hemmt ⁴⁶).

Zur Frage, ob Insulin den Effekt kataboler Hormone über das Adenylat-Cyclasesystem antagonisiert, oder ob es die Phosphodiesteraseaktivität stimuliert, während das Cyclasesystem durch die katabolen Hormone aktiviert bleibt; konnte als eine Antwort der experimentell gesicherte Beweis des in vitro Glucagonantagonismus gegeben werden ⁶²).

Auf Grund der Ergebnisse zahlreicher Untersuchungen ist es beim jetzigen Stand wahrscheinlich, daß das Adenylat-Cyclasesystem eines der ersten Angriffsziele des Insulins ist und daß c-AMP als ein "second messenger" fungiert.

8. Experimenteller Teil

8.1. Darstellung der Styrol-Acrylsäure-Copolymeren (85:15, 95:5)

In einem 100 ml Kolben werden 30 mg AIBN eingewogen. Durch mehrmaliges Evakuieren und Füllen mit Stickstoff wird der Kolben von Luft befreit. Dann füllt man nacheinander 20 ml Benzol als Lösungsmittel, 9,74 (10,9) ml Styrol und 1,02 (0,34) ml Acrylsäure ein, die alle unter Stickstoff vorher frisch destilliert werden. Dem Kolben setzt man nun einen Rückflußkühler mit Quecksilberventil auf; anschließend wird die ganze Apparatur ca. 5 Minuten mit einem kräftigen Stickstoffstrom durchgeblasen.

Unter starkem Rühren läßt man den Ansatz bei 50 °C in N₂-Gasatmosphäre etwa 7 Stdn reagieren. Nach Abbruch der Reaktion wird das Benzol vom Copolymerisat abfiltriert. Das Reaktionsprodukt wird in Dioxan gelöst und zweimal in 20-fachen Überschuß Wasser versprüht. Nach Abfiltrieren des Wassers wird das Copolymere wiederum in Dioxan gelöst und ebenfalls in 20-fachen Überschuß Hexan versprüht. Nach Filtration trocknet man das Copolymere ca. 50 Stdn im Hochvakuum.

Analyse:

Gef.: C 80,47 H 7,87 (95:5) Gef.: C 85,05 H 7,46 (85:15)

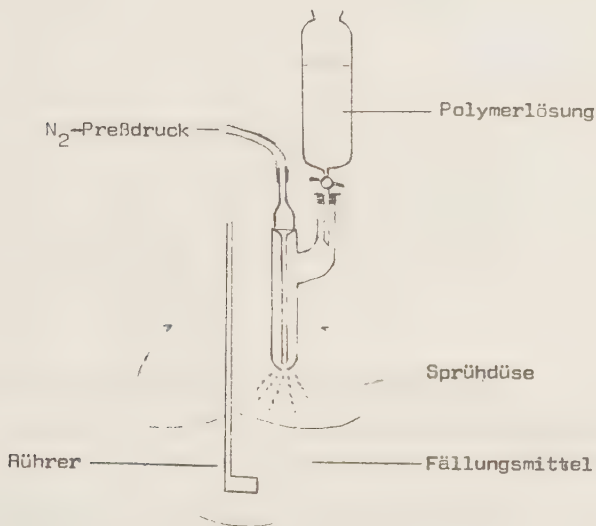
Ber.: C 80,8 H 7,1 Ber.: C 85,39 H 7,34

8.1.1. Aktivierung der Copolymeren

In einem Kolben mit 30 ml Hexan bzw. Essigsäureäthylester werden 550 mg (1,66 g) Copolymeres, 9,6 mg N-Hydroxysuccinimid und 17,2 mg DCC gegeben. Nach ca. 50 Stdn Rühren bei Raumtemp. wird filtriert und das Polymere im Hochvakuum getrocknet.

Bei der Aktivierung in Dimethylformamid werden 30 ml Lösungsmittel mit 550 mg Polymerem, 96 mg N-Hydroxysuccinimid und 172 mg DCC vereinigt. Die Reaktionspartner lösen sich sofort in Dimethylformamid auf. Der Reaktionsverlauf entspricht dem vorher beschriebenen, wobei aber Dicyclohexylharnstoff ausfällt, der nach Abbruch der

Reaktion abfiltriert wird. Das aktivierte Copolymere kann anschließend in Hexan gefällt werden. Danach wird es 50 Stdn im Hochvakuum getrocknet.



Sprühfällungsapparatur für Polymerlösungen ^{64,65)}

8.1.2. Reaktion des Insulins mit Citraconsäureanhydrid

50 mg Insulin (Rinderinsulin) werden mit einem dreifachen Überschuß von in 10 ml Wasser gelöstem Citraconsäureanhydrid versetzt. Nach kurzer Zeit geht das Insulin in Lösung, welche daraufhin mit 0,1n NaHCO₃ auf pH 7 eingestellt wird. Nach ca. zwei Stdn ist die Reaktion, die unter starkem Rühren stattfindet, beendet.

8.1.3. Kopplung des Insulins mit dem Styrol-Acrylsäure-Copolymeren in heterogener Reaktion

Zu der unter 8.1.2. beschriebenen Reaktionslösung gibt man 56 mg des aktivierten Copolymeren (560 mg vom Copolymeren 95:5) und läßt es 48 Stdn reagieren.

8.1.4. Abspaltung der Citraconsäure vom Insulin

Nach Abbruch der Kopplungsreaktion werden die Reaktionsgemische mit 0,1n HCl auf pH 3,5 eingestellt und 36 Stdn gerührt. Danach wird filtriert und das Reaktionsprodukt nochmals mit Wasser gewaschen. Der Gehalt an Insulin pro Gramm Polymeres ist in Tab. 3 aufgeführt.

8.2. Darstellung von Styrol-Acrylsäurechlorid-Copolymeren und deren direkte Kopplung mit Insulin

8.2.1. Darstellung von Acrylsäurechlorid (monomer) ⁶³⁾

In eine Destillationsapparatur, bestehend aus 1l Rundkolben, Kühler und Vorlage, werden 185 ml wasserfreie, stabilisierte Acrylsäure, 639 ml Benzoylchlorid und 0,5 g Hydrochinon eingefüllt. Durch die Apparatur wird ein kräftiger Stickstoffstrom geleitet; sie ist gegen die Aussenluft durch ein Quecksilberventil abgeschlossen. Im Ölbad wird zunächst auf 100-110 °C erhitzt. Wenn das Sieden nachläßt, wird die Öltemperatur langsam auf 200 °C gesteigert. Das bis 85 °C übergehende Destillat wird in der mit 1,5 g Hydrochinon beschickten, mit Eis gekühlten Vorlage aufgefangen. Zur Reinigung des Rohproduktes wird noch einmal destilliert, wobei die bei 74 °C übergehende Fraktion aufgefangen und sogleich wieder mit Hydrochinon stabilisiert wird.

8.2.2. Darstellung des Acrylsäurechlorid-Styrol-Copolymeren

109 ml Styrol (103,3) und 3,97 ml Acrylsäurechlorid (7,94) werden unter Stickstoff in 200 ml absol. Benzol gegeben und mit 150 mg AIBN bei 50 °C ca. 100 Stdn polymerisiert. Die gelbliche viskose Reaktionslösung wird in Hexan gefüllt und im Hochvakuum getrocknet. Die entstandenen Copolymeren bestehen zu 85% (75%) aus Styroleinheiten und zu 15% (25%) aus Acrylsäureeinheiten.

Analyse:

(85% Styrol)	Ber.: C 85,28	H 7,16
	Gef.: C 85,52	H 7,13
(75% Styrol)	Ber.: C 80,48	H 6,75
	Gef.: C 80,03	H 6,48

8.2.3. Direkte Kopplung der Copolymeren mit Insulin

700 mg des Polymeren werden in maximal 40 ml Dimethylformamid gelöst. Dazu werden 50 mg Insulin gegeben und ca. 1/2 Stde gerührt. Anschließend wird filtriert und zu der Lösung etwa ein g Wasser hinzugefügt und ca. 15 Stdn gerührt (Abspaltung der Citraconsäure). Nach Zugabe von 40 ml Wasser fällt ein feinflockiger weißer Niederschlag aus, der abfiltriert und im Hochvakuum getrocknet wird. Das Produkt wird in 8 ml Dimethylformamid/Äther (6:1) gelöst und mehrmals über eine Sephadex (LH 20)-Säule chromatographiert. Die Menge des gekoppelten Insulins pro Gramm Polymeres ist in Tab. 3 aufgeführt.

8.3. Darstellung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon(Acryloyl-2-Hydroxypyridin; Acryloyl-1,2,4-Triazol; Acryloyl-Succinimid)-Copolymer und deren direkte Kopplung mit Insulin

8.3.1. Darstellung von Polyacrylsäurechlorid

In eine Ampulle werden 50 mg AIBN eingewogen. Unter Ausschluß von Luft und Feuchtigkeit werden 3 ml durch fraktionierte Destillation

entstabilisiertes Säurechlorid und 3 ml über ein Molekularsieb (4 Å) getrocknetes Dioxan eingefüllt und abgeschmolzen. Man polymerisiert 48 Stdn bei 50 °C.

Um eine genügend große Menge an Polyacrylsäurechlorid zur Verfügung zu haben, werden gleichzeitig mehrere Polymerisationen durchgeführt. Das Gemisch Dioxan-Polyacrylsäurechlorid wird aus den Ampullen in den Tropftrichter einer Sprühhapparat gefüllt und mit etwas Dioxan verdünnt. In einen 2l-Kolben mit ca. 1,5l Hexan wird das Produkt unter Stickstoff gefällt. Das Polymerisat sammelt sich am Boden des Kolbens und das Hexan kann abdekantiert werden. Das Polyacrylsäurechlorid wird dann in Dioxan aufgenommen und verarbeitet.

Analyse: Ber.: C 39,78 H 3,32
Gef.: C 41,82 H 3,77

8.3.2. Darstellung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copolymer

Zu 21,5 g in Dioxan gelöstem Polyacrylsäurechlorid werden in einem Kolben unter Stickstoff und starkem Rühren 16,3 g Pyrrolidinon tropfenweise zugegeben. Kurz nach der Beendigung der Aminzugabe fällt unlösliches Pyrrolidinonhydrochlorid aus. Es wird noch etwa 24 Stdn unter Feuchtigkeitsausschluß (CaCl₂-Rohr) bei Raumtemp. gerührt. Nach Filtration wird das in Dioxan lösliche Reaktionsprodukt in Hexan versprüht. Das erhaltene Copolymere besteht zu ca. 30% aus Polyacryloylpyrrolidinon.

Analyse: Ber.: C 48,46 H 4,61 N 4,04
Gef.: C 49,89 H 4,47 N 3,89

8.3.3. Kopplung von Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copolymer mit Insulin

50 mg Insulin werden mit Citraconsäure geschützt und das Wasser nach der Reaktion im Hochvakuum entfernt. Anschließend wird das Insulin noch 3 Stdn scharf getrocknet.

Zum Insulin gibt man anschließend 500 mg in 20 ml getrocknetem Dimethylformamid gelöstes Copolymeres, worauf sich das Insulin sofort auflöst. Es wird 40 Stdn gerührt. Nach Abbruch der Reaktion wird solange H_2O zugegeben bis sich keine Trübung mehr zeigt, wobei mit 0,1n $NaHCO_3$ pH 7 eingestellt und gehalten wird.

Die Abspaltung der Citraconsäure erfolgt wie bereits beschrieben. Das Kopplungsprodukt wird dann durch Abziehen der Lösungsmittel im Hochvakuum gewonnen.

8.3.4. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit 2-Hydroxypyridin

Zur Lösung von 9,26 g Polyacrylsäurechlorid in 60 ml Dioxan werden unter N_2 -Gasschutz 7,8 g 2-Hydroxypyridin in 200 ml Dioxan langsam zugegeben. Es fällt sofort ein Niederschlag aus, der sich nach Zugabe weiterer 200 ml Dioxan größtenteils wieder löst. Nach Filtration wird das Filtrat eingeeengt (ca. 50 ml) und in viel Hexan versprüht. Weiße Flocken, die im Hochvakuum 8 Stdn getrocknet werden. Unter diesen Bedingungen treffen im Polymeren auf 10 Acrylsäurechlorideinheiten vier 2-Hydroxypyridineinheiten.

8.3.5. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit 1,2,4-Triazol

Zu 11 g Polyacrylsäurechlorid in 70 ml Tetrahydrofuran wird eine Lösung aus 6,7 g Triazol in 200 ml Tetrahydrofuran getropft. Es fällt sofort ein weißer Niederschlag aus (1,2,4-Triazolhydrochlorid). Nach Filtration wird die Lösung in ca. 3 l Hexan gefüllt. Das feinflockige Produkt wird mit Hexan gewaschen und im Hochvakuum 150 Stdn getrocknet. Pro 10 Einheiten Acrylsäurechlorid treffen vier 1,2,4-

Triazoleinheiten.

8.3.6. Umsetzung von Polyacrylsäurechlorid mit Succinimid

7,5 g Polyacrylsäurechlorid und 4,1 g Succinimid werden in je 50 ml absol. Dioxan gelöst, zusammengegeben und gerührt.

Nach 10 Stdn wird das ausgefallene Salz abfiltriert und die Lösung eingeengt. Diese wird anschließend in viel Hexan versprüht und das feinflockige Produkt 200 Stdn im Hochvakuum getrocknet. Auf 10 Acrylsäurechlorideinheiten treffen 3 Succinimideinheiten.

Die Kopplung mit Insulin verläuft wie bereits vorher beschrieben durch direkten Angriff der Säurechloridgruppen auf die Lysin-NH₂-Gruppe des terminalständig geschützten Insulins.

Präparation; beschrieben unter der Nummer:	Insulin mg/g Hochpolymeres
a) 8.1.1., Hexan, 85:15	3
b) 8.1.1., Hexan, 85:15, besonders langkettig, 1,5 g Copolymeres	16
c) 8.2.3., 85:15, 700 mg Polymeres	25
d) analog c) (Prüfung der Reproduzierbarkeit)	21
e) 8.3.6., 700 mg Polymeres	4
f) 8.3.6., 900 mg Polymeres, Insulinkopplungszeit: 30 Min., schnellere Verarbeitung als e)	34

Tab. 3: Insulingehalt verschiedener synthetisierter Hochpolymere nach Säurehydrolyse und quantitativer Aminosäureanalyse.

8.4. Darstellung von Metallkomplexen der mit komplexierenden Gruppen modifizierten Acrylsäurepolymeren

8.4.1. Metallkomplexe mit Acrylsäure-Acryloylpyrrolidinon-Copolymer

Acrylsäurechlorid-Acryloylpyrrolidinon-Copolymer wird bei pH 7 (mit 0,1n NaHCO_3 eingestellt) in ca. 30 ml Wasser gelöst. Dazu gibt man tropfenweise unter starkem Rühren das in möglichst wenig Wasser gelöste Metallsalz.

Metallverbindung	Menge in mg	Menge des Polymeren in mg
$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	200	250
$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	600	250
$\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$	600	500
$\text{La}(\text{NO}_3)_3$	500	500

Die ausgefallenen, wasserunlöslichen Komplexe werden filtriert, gewaschen und im Hochvakuum ca. 70 Stdn getrocknet.

8.4.2. Darstellung der Metallkomplexe mit Acrylsäure-Succinimid-Copolymer

8.4.2.1. Mit $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$

300 mg Polymeres werden in 25 ml H_2O gelöst unter Zugabe von ca. 400 mg NaHCO_3 (pH 7). Dazu werden 370 mg $\text{BaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, gelöst in wenig Wasser, gegeben. Sofort fällt ein weißer Niederschlag aus, der filtriert und getrocknet wird. Der Komplex enthält ca. 4,3% Ba und 1,5% Na.

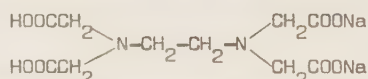
8.4.2.2. Mit $\text{Cu}(\text{acetat})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

400 mg Polymeres werden in 25 ml Wasser unter Zugabe von 430 mg NaHCO_3 gelöst (pH 7). Dazu werden 300 mg $\text{Cu}(\text{acetat})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, in wenig

Wasser gelöst, zugetropft. Der blaue Niederschlag wird abgesaugt, gewaschen und getrocknet. Der Komplex enthält ca. 7% Na^+ als Acrylsäuresalz und ca. 11,9% Kupfer zur Hälfte als Acrylsäuresalz und zur Hälfte als Succinimidkomplex gebunden.

8.4.3. Bestimmung des Metallgehalts in den Copolymerkomplexen durch komplexometrische Titration mit EDTA.⁶⁶⁾

Die Bestimmung des Metallgehalts erfolgt durch Titration mit Titriplex III (EDTA). Dazu müssen die Metalle als freie Ionen vorliegen, weshalb die Komplexe in konzentrierter HNO_3 gelöst und eingedampft werden. Dadurch werden sie vollständig zerstört und die Metallionen können anschließend in Wasser aufgenommen werden. Die Titration beruht darauf, daß die Metallionen durch Titriplex III als wasserlösliche, undissoziierte innere Komplexe (Chelate) gebunden werden. Titriplex III = Dinatriumsalz der Äthylendiamintetraessigsäure



Die Metalle werden mit 0,1 molarer Titriplex III Maßlösung titriert, wobei der Titrationsendpunkt dadurch zu erkennen ist, daß besonders ausgewählte Metallindikatoren zugesetzt werden, die nach der Chelatbindung des Metalls an Titriplex III im Farbton umschlagen. Bei der Titration mit Titriplex III werden zwei verschiedene Verfahren, die direkte und die Rücktitration, angewendet. Im ersten Fall werden die zu bestimmenden Kationen (Cu^{2+} , Pb^{2+} , La^{2+}) in gepufferter Lösung gegen ausgewählte Metallindikatoren direkt titriert. Die Rücktitration dagegen basiert auf der geringen Stabilität der Zinkchelate mit Titriplex III im Vergleich zu den entsprechenden Chelaten anderer Kationen. Es wird hierbei der Lösung ein bekanntes Volumen an Titriplex III zugesetzt und deren Überschuß mit Zinksulfatlösung der gleichen Molarität bestimmt. Je 100 mg der Komplexe werden in ca. 50 ml konz. HNO_3 gelöst und eingedampft. Anschließend wird das Produkt in Wasser gelöst und

titriert. Die titrierte Menge Metall entspricht somit dem prozentualen Gewichtsanteil.

8.4.3.1. Bleititration

Die Lösung wird mit 10 ml 1m Kaliumnatriumtartratlösung, 1 Indikator-Puffertablette und mit 1m Ammoniaklösung versetzt. Der pH-Wert soll bei 10-10,5 liegen, evtl. ist die Ammoniakzugabe zu erhöhen. Die Lösung wird etwa auf 40 °C erwärmt und sogleich mit 0,1m Titriplex III Lösung bis zum Farbumschlag von rot nach grün titriert.

1 ml 0,1m Titriplex III Lösung = 20,721 mg Pb

verbrauchte Menge: 0,85 ml = 17,6 mg Pb

8.4.3.2. Kupfertitration

Die annähernd neutrale Kupfer(II)salzlösung wird mit 5 ml etwa 2m Natriumacetatlösung versetzt. Der pH-Wert der Lösung soll bei 6 liegen. Nach Zugabe von etwa 0,3 ml Chromurazol S wird mit 0,1m Titriplex III Lösung bis zum Farbumschlag von blau nach grün titriert.

1 ml 0,1m Titriplex III Lösung = 6,354 mg Cu

verbrauchte Menge: 2,25 ml = 14,4 mg Cu

8.4.3.3. Lanthantitration

Die Lösung wird bis auf etwa 100 ml mit Wasser verdünnt, mit Natriumacetat auf pH 6 eingestellt, mit 50-100 mg Xylenolorange-Indikator-Verreibung versetzt und mit 0,1m Titriplex III Lösung nach rein-gelb titriert.

1 ml 0,1m Titriplex III Lösung = 13,891 mg Lanthan

verbrauchte Menge: 1,2 ml = 16,67 mg Lanthan

8.4.3.4. Quecksilbertitration

Die annähernd neutrale Lösung des Quecksilber(II)salzes wird mit 5 ml 0,1m Titriplex III Lösung versetzt. Nach etwa 5 Minuten werden

eine Indikator-Puffertablette und 1 ml Ammoniaklösung zugegeben.

Der Überschuß an Titriplex III Lösung wird mit 0,1m Zinksulfat-lösung bis zum Farbumschlag nach rosa zurücktitriert.

1 ml 0,1m Titriplex III Lösung = 20,061 mg Hg

Verbrauch an 0,1m ZnSO_4 -Lösung: 4,13 ml

Verbrauch an Titriplex III Lösung: 0,87 ml = 17,4 mg Hg

9. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, der Fragestellung nach der extra- oder intrazellulären Wirkung des Insulins durch vorbereitende, grundlegende Untersuchungen nachzugehen. Es sollte der Weg für die endgültige Beantwortung dieser Frage durch fundierte experimentelle Forschungsarbeiten aufgezeigt werden.

Das Eindringen von Insulin in die Zelle kann verhindert werden, wenn Insulin an ein unlösliches Polymeres gekoppelt wird. Wird andererseits Insulin an ein lösliches Polymeres, das außerdem noch chelatbildende Gruppen enthält, gebunden, so kann nach Reaktion des Insulins an oder in der Zelle der Wirkungsort nach Komplexierung der Chelat-Gruppen mit schweren Metallionen elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Der erste Teil der Arbeit befaßt sich mit der Synthese von wasserunlöslichen Polymeren und deren Kopplung an Insulin.

Es wurden eine Reihe von Styrol-Acrylsäure-Copolymeren mit wechselnden Styrol/Acrylsäureanteilen und verschiedenen Vernetzungsgraden durch radikalische Polymerisation erstmals dargestellt. Diese neuen Copolymeren wurden IR- und KMR-spektroskopisch sowie elementaranalytisch untersucht und charakterisiert.

Die Kopplung an Insulin erfolgte mit diesen Copolymeren mittels DCC und N-Hydroxysuccinimid in heterogener Reaktion. Die beiden N-terminalen Aminosäuren des Insulins, Phenylalanin und Glycin, wurden dabei mit Citraconsäureanhydrid geschützt. Die chemische Bindung des Polymeren erfolgte dadurch an die ϵ -Aminogruppe des Lysins. Umfangreiche Waschungsprozeduren der Kopplungsprodukte führten zu Substanzen, die bei 280 nm eine optische Dichte von 0 aufwiesen, die aber trotzdem nicht ganz frei von adsorbierten oder sonstwie freigesetztem Insulin waren.

Um auch die wasserunlöslichen Copolymeren in Lösung an Insulin koppeln und anschließend chromatographieren zu können, wurden Styrol-Acrylsäurechlorid-Copolymere ebenfalls durch radikalische Polymerisation erstmals synthetisiert. Diese wurden wieder

spektroskopisch und elementaranalytisch abgesichert.

Da in diesen Copolymeren anstatt der Acrylsäuregruppen Acrylsäurechloridgruppen vorhanden sind, konnte auf eine Aktivierung mittels DCC und N-Hydroxysuccinimid verzichtet werden, denn die Säurechloridgruppierung steht in ihrer Aktivität weit über der aktiven Estergruppierung. Die Kopplung mit citraconsäuregeschütztem Insulin wurde direkt in Dimethylformamid unter Feuchtigkeitsausschluß bei kurzer Reaktionsdauer durchgeführt. Nach dem Abspalten der Citraconsäure wurde das gelöste Kopplungsprodukt mehrmals über eine Sephadex-Säule chromatographiert. Durch Sprühfällung in Wasser - eine Apparatur wurde speziell dazu entwickelt - konnte bei gleichzeitiger Hydrolyse der restlichen Säurechloridgruppen das an Insulin gekoppelte Copolymere als reinweißes, feinflockiges Produkt erhalten werden.

Eine abnehmende geringfügige Abspaltbarkeit des Insulins - die optische Dichte ging wieder gegen null - zeigte, daß die Gleichgewichtskonstante der Kopplungsreaktion noch nicht genügend klein ist, daß aber ein steigender Styrolanteil im Copolymeren eine Stabilisierung dieser chemischen Bindung bewirkt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden wasserlösliche Polymere synthetisiert, die außer funktionellen Gruppen für die Kopplung ans Insulin auch noch chelatisierende Gruppen enthalten, die für eine Bindung zu Metallionen besonders befähigt sein sollten. Dazu wurde Acrylsäurechlorid radikalisch mit AIBN als Starter unter Luftausschluß polymerisiert und das Polymerisationsprodukt spektroskopisch und elementaranalytisch gesichert.

Mit Pyrrolidinon, 2-Hydroxypyridin, 1,2,4-Triazol und Succinimid, die mit den Säurechloridgruppen reagierten, gelang es, neue Copolymere des Polyacrylsäurechlorids ebenfalls erstmals darzustellen. Je nach der Menge des eingesetzten Heterocyclus konnten verschiedene, mit dem jeweiligen Heterocyclus "bestückte" Polymere erhalten werden. Es konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der durch den Heterocyclus amidierten Säuregruppen Auswirkungen auf

die Wasserlöslichkeit des entstehenden Polymeren hat, so daß der Verwendbarkeit solcher Polymeren dadurch Grenzen gesetzt sind. Sämtliche synthetisierten Copolymere wurden wieder spektroskopisch und elementaranalytisch charakterisiert. Bei Verwendung von Succinimid konnte die beste Löslichkeit in wäßriger Lösung gefunden werden, wobei aber beobachtet werden konnte, daß die Löslichkeit bei allen Polymeren infolge Vernetzungsreaktionen und Alterungsvorgängen langsam abnimmt.

Die direkte Kopplung ans citraconsäuregeschützte Insulin und die chromatographische Reinigung der Reaktionsprodukte gelang sehr gut und führte zu den gewünschten wasserlöslichen, Insulin enthaltenden Molekülen, die in der Lage sein sollten, zahlreiche Metallionen koordinativ fest zu binden.

Diese Bindung von Metallionen war nun Gegenstand von Untersuchungen, mit denen sich der dritte Teil der vorliegenden Arbeit befaßt. Es wurden die koordinierenden Eigenschaften der beiden Copolymeren mit Pyrrolidinon bzw. Succinimid als Chelatgruppierungen untersucht.

Acrylsäure-Acryloylpyrrolidinon-Copolymer wurde mit Kupfer(II)-acetat, Blei(II)nitrat, Quecksilber(II)nitrat und Lanthan(II)-nitrat in wäßriger Lösung umgesetzt; Acrylsäure-Acryloylsuccinimid-Copolymer mit Kupfer(II)acetat und Barium(II)chlorid.

In diesen, infolge hoher Vernetzung über Metallionen, die als Brücken fungieren, wasserunlöslichen Komplexen sind die Metalle einerseits über die Chelate der Polymeren, andererseits auch über die Sauerstoffionen zweier benachbarter Säuregruppen gebunden. Da in der Reaktionslösung infolge Zugabe von NaHCO_3 -Lösung Na^+ -Ionen vorhanden sind, findet auch eine Bildung von Natrium-carboxylat statt. An Hand der Elementaranalysen, wobei die Metalle mit Hilfe der komplexometrischen Titration mit Titriplex III selbst analysiert wurden, konnte die Zusammensetzung der Komplexe berechnet werden. Es fanden sich je nach Komplex verschiedene Anteile chelatgebundenen zu carboxylatgebundenen Metalls. Beispielsweise sind etwa die Hälfte der Kupferionen im Komplex mit Acryl-

säure-Acryloylpyrrolidinon-Copolymer chelatgebunden, die restlichen 50% Kupfer sind über zwei Säuregruppen als Carboxylationen gebunden. Etwa 25% der noch vorhandenen Säuregruppen liegen als Natriumcarboxylat vor.

Die Copolymeren sind also in der Lage, Metallionen zu binden, und es kann vermutet werden, daß sie sich dazu eignen werden, gekoppelt an Insulin, dieses an seinem Wirkungsort elektronenmikroskopisch sichtbar zu machen.

Abschließend kann gesagt werden, daß durch die in dieser Arbeit eingeführte Kopplung des Insulins an polymere Säurechloride, die in ihrer äußerst starken Aktivität durch die Copolymerpartnereinheiten auf ein nicht mehr schädigendes Maß abgeschwächt werden konnten, es erst möglich war, das Insulin mit sehr kurzen Reaktionszeiten zu koppeln, wodurch äußerst günstige Bedingungen für das Verhindern von Vernetzungsreaktionen und damit für eine gute Löslichkeit gegeben sind. Daneben hat diese Art der Kopplung den Vorteil, praktisch keine störenden bzw. verunreinigenden Moleküle, wie sie z.B. bei der Umsetzung esteraktivierter Säuregruppen auftreten, mitschleppen und für deren Entfernung sorgen zu müssen.

Es ist also gelungen, durch die Darstellung von neuen, speziellen wasser- und wasserunlöslichen Copolymeren, deren Kopplung an Insulin und Komplexierung an Metallionen, die Grundlagen für die experimentelle Antwort auf die anfangs diskutierte Frage nach dem Wirkungsort des Insulins an oder in der Zelle zu schaffen.

10. Literaturverzeichnis

- 1) S.J. Pilgis und C.R. Park, Ann. Rev. Pharmacol. 14, 368 (1974)
- 2) M.E. Krah1, Ann. Rev. Physiol. 36, 331 (1974)
- 3) G. Löffler und L. Weiss, Handbuch der Inneren Medizin VII/2A, (Hrsg. K. Oberdisse) Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 249-303 (1975)
- 4) R. Geiger, Chemiker Ztg. 100, 111 (1976)
- 5) P. Cuatrecasas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63, 450 (1969)
- 6) H.J. Kolb, R. Renner, K.D. Hepp, L. Weiss und O.H. Wieland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 248 (1975)
- 7) I.D. Goldfine und G.J. Smith, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 1427 (1976)
- 8) I.D. Goldfine, G.J. Smith, K.Y. Wong und A.L. Jones, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1368 (1977)
- 9) G. Henrici-Olive und S. Olive, Polymerisation, Chemisches Taschenbuch, Verlag Chemie, Weinheim 1969
- 10) D. Braun, H. Cherdron und W. Kern, Praktikum der makromolekularen organischen Chemie, Verlag Alfred Hüthig, Heidelberg 1971
- 11) Houben-Weyl, Makromolekulare Stoffe I, 14/1, Thieme Verlag, Stuttgart 1961
- 12) H.G. Elias, Makromoleküle, Hüthig und Wepf Verlag, Basel 1971
- 13) W.R. Sorensen und T.W. Campbell, Präparative Methoden der Polymeren-Chemie, Verlag Chemie, Weinheim 1962
- 14) D.H. Williams, I. Fleming, Spektroskopische Methoden zur Strukturaufklärung, Thieme Verlag, Stuttgart 1975
- 15) G.H. Herzberg, Infrared and Raman Spectra, D. van Nostrand Company, Inc. Princeton, New Jersey, New York 1956
- 16) L.J. Bellamy, The Infra-red Spectra of Complex Molecules, John Wiley and Sons, Inc. New York 1960
- 17) K. Nakamoto, Infrared Spectra of Inorganic and Coordination Compounds, Wiley-Interscience, New York, London 1969
- 18) H. Günther, NMR-Spektroskopie, Thieme Verlag, Stuttgart 1973

- 19) H.J. Keller, NMR Basic Principles and Progress, Vol. 2, Springer Verlag 1970
- 20) J.W. Emsley, J. Feeney und L.H. Sutcliffe, High Resolution Nucl. Magn. Resonance Spectroscopie 1, (1965); 2, (1966)
- 21) E. Buddecke, Grundriss der Biochemie, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York 1974
- 22) Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Bd. 14/1, 771, 774, 775, Thieme Verlag, Stuttgart 1961
- 23) H.G. Biedermann, M. Eiband, H. Guntner und H.J. Kolb, Z. Naturforsch. im Druck
- 24) A. Geiger, Chemie in unserer Zeit, 2, 131 (1973)
- 25) B.U. v. Specht, H. Seinfeld und W. Brendel, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., 354, 1659 (1973)
- 26) H. Zahn, D. Brandenburg und H.G. Gattner, Fiftieth Anniversary Insulin Symposium, Indianapolis, Indiana, 18-20, 468 (1971)
- 27) H.J. Kolb, B.U. v. Specht, R. Renner und K.D. Hepp, Diabetes 25, 370 (1976)
- 28) D.H. Spackman, W.H. Stein und S. Moore, Anal. Chem. 30, 1190 (1958)
- 29) R.C. Schulz, P. Elzner und W. Kern, Makromol. Chem. 42, 189 (1960)
- 30) R.C. Schulz, P. Elzner und W. Kern, Makromol. Chem. 42, 197 (1960)
- 31) B.U. v. Specht, M. Wahl, H.J. Kolb und W. Brendel, Archives internationales de Pharmacodynamie et de Therapie, 213, 242 (1975)
- 32) D.M. Krämer und K. Lehmann, Febs Letters, 22, 49 (1972)
- 33) H.G. Biedermann, J. Obwandner und K. Wichmann, Z. Naturforsch. 27b, 1332 (1972)
- 34) H.G. Biedermann, E. Griebel und K. Wichmann, Makromol. Chem. 172, 49 (1973)
- 35) H.G. Biedermann, Habilitationsschrift, Technische Universität München 1974

- 36) J. v. Mehring und O. Minkowski, Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 26, 371 (1890)
- 37) E.L. Scott, Amer. J. Physiol. 29, 306 (1911/12)
- 38) J.J.R. McLeod: Carbohydrate Metabolism and Insulin. New York - London 1926; deutsch: J. Springer, Berlin 1927
- 39) K.M. Mellinghoff, "Georg Ludwig Zuelzers Beitrag zur Insulinforschung", Diss. Med., Düsseldorf 1970
- 40) F.G. Banting und C.H. Best, J. Lab. Clin. Med. 7, 251 (1922)
- 41) D.F. Steiner, Triangel 11, 51 (1972)
- 42) G.M. Grodsky, L.L. Bennett, Proc. Exper. Biol. Med. 114, 769 (1963)
- 43) G.M. Grodsky, Diabetes 14, 396 (1965)
- 44) H.A. Harper, G. Löffler, P.E. Petrides, L. Weiss, Physiologische Chemie, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1975
- 45) J.S. Flier, C.R. Kahn und R.S. Bar, Science 190, 4209 (1975)
- 46) K.D. Hepp, Diabetologia 13, 177 (1977)
- 47) W.C. Stadie, N. Hargaard, A.G. Hills und J.B. Marsh, Am. J. Med. Sci. 218, 265 (1949)
- 48) P. Cuatrecasas, Annu. Rev. Biochem. 43, 169 (1974)
- 49) P. De Meyts, J. Supramol. Struct. 4, 241 (1976)
- 50) K.D. Hepp und H.J. Kolb, unveröffentlichte Ergebnisse
- 51) C.R. Kahn, D.M. Neville und J. Roth, J. Biol. Chem. 248, 244 (1973)
- 52) D. Baxter und N.R. Lazarus, Diabetologia 11, 261 (1975)
- 53) P. Kern, J. Picard, M. Caron und D. Veissière, Biochim. Biophys. Acta 389, 281 (1975)
- 54) M.E. Fargue und P. Freychet, Diabetes 24, 715 (1975)
- 55) J.A. Archer, P. Gorden und J. Roth, J. Clin. Invest. 55, 166 (1975)
- 56) J.M. Olefsky und G.M. Reaven, J. Clin. Invest. 54, 1323 (1974)
- 57) K.D. Hepp, J. Langley, H.J. v. Funke, R. Renner und W. Kemmler, Nature 258, 154 (1975)
- 58) W. Kemmler, R. Renner, H.J. v. Funke und K.D. Hepp, IX. Congress of the Int. Diabetes Fed. (Abstr.), p. 160, Amsterdam: Excerpta Medica Congress Series 1976
- 59) C.R. Kahn, D.M. Neville, A. Soll und J. Roth, VIII. Congress Int. Diabetes Fed. (Abstr.), p. 75, Amsterdam: Excerpta Medica Congress Series 1973

- 60) J.S. Flier, C.R. Kahn, J. Roth und R.S. Bar, Science 190, 63
(1975)
- 61) R.W. Butcher, C.E. Baird und E.W. Sutherland, J. Biol. Chem. 243,
1705 (1968)
- 62) K.O. Hepp, Febs Lett. 12, 263 (1971)
- 63) Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin 1975
- 64) K. Wichmann, Doktorarbeit, Technische Universität München 1973
- 65) W. Graf, Doktorarbeit, Technische Universität München 1975
- 66) Komplexometrische Bestimmungsmethoden mit Titriplex III, E. Merck,
Darmstadt 1966

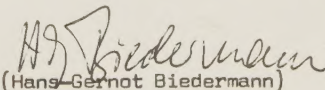
Herrn Prof. Dr. H. Mehnert und Herrn Priv. Doz. Dr. E. Standl danke ich für ihr Interesse an dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. H. Kolb bin ich für seine Bemühungen um diese Arbeit, für seine Hilfsbereitschaft und für seinen persönlichen Kontakt zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

6. 2. 1944 geboren in Breslau; Eltern: Rudolf Biedermann und
Else Biedermann, geb. Hantke
- 1950-1956 Volksschule in Grafenau/Bayer. Wald
- 1956-1962 Oberrealschule in Zwiesel und Pfarrkirchen
- Sept. 62-Sept. 63 Laborantenlehre bei der "Wacker-Chemie" in Burghausen
- 1963-1965 Oberrealschule in Pfarrkirchen mit Abitur
- Nov. 65-Sept. 69 Chemiestudium an der Technischen Universität in
München
- 1969-Juni 1971 Experimentelle Doktorarbeit am anorg. chem. Institut
der Technischen Universität München mit Promotion
zum Dr. rer. nat.
- 1971-Sept. 1974 Habilitationsarbeit mit Habilitation zum
Dr. rer. nat. habil.; anschließend Dozent am anorg.
chem. Institut der TU München
- Mai 1973 Beginn des Medizinstudiums an der Universität München;
1974 Physikum; 1975 Staatsexamen Teil I; 1977 Staats-
examen Teil II
- Jan. 1976 Beginn der experimentellen Doktorarbeit am Institut
für Diabetesforschung im Krankenhaus München-
Schwabing
25. 6. 1976 Eheschließung mit Sylvia Biedermann, geb. Heywang

München, 18. 12. 1977


(Hans-Gernot Biedermann)

